

**Analyse der Genexpression und Charakterisierung der  
biologischen Wirkung in der humanen T-Lymphom-Zelllinie  
Jurkat nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Marcus Unverricht-Yeboah  
geboren in Neubrandenburg

Juli, 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Forschungszentrum Jülich GmbH, in der Arbeitsgruppe Strahlenbiologie des Geschäftsbereichs Sicherheit und Strahlenschutz durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Johannes

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2015

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. George Iliakis für die interessante Themenstellung und für die Übernahme des Gutachtens.

Für die engagierte und umfassende Betreuung meiner Promotion und für viele motivierende und hilfreiche Gespräche gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Ralf Kriehuber.

Bei Dr. Pomplun und Dr. Kümmerle möchte ich mich für die Hilfe bei den dosimetrischen Berechnungen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dominik Oskamp, Dr. Volker Dahmen und Marcel von Ameln sowie allen anderen Mitarbeitern der AG Strahlenbiologie für das freundliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem danke ich Dr. Ulrich Giesen, der mich während meines Aufenthaltes an der PTB in Braunschweig unterstützt hat.

Mein allerliebster Dank gilt meiner Frau Amma für ihre immer währende Unterstützung, Motivation, Geduld und Rückhalt insbesondere in den sehr schwierigen Abschnitten dieser Arbeit. Meda w'ase paa. Medo wo. Ebenso bedanke ich mich bei meinem Sohn Jan-Elias Kweku, der mir viel Freude bringt, „Dasii“.

Herzlichen Dank gilt meinen Eltern Christel und Dietmar für die fortwährende Unterstützung während meines Studiums, der Promotion und darüber hinaus.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
---------------------------------	----------

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
------------------------------------	----------

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen .....	1
1.1.1 $\gamma$ -Strahlung.....	2
1.1.2 $\alpha$ -Strahlung .....	2
1.1.3 Auger-Elektronen-Emitter .....	2
1.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung auf zellulärer Ebene .....	4
1.2.1 Strahlenqualitäten und deren unterschiedliche biologische Wirksamkeit.....	5
1.2.1.1 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Strahlenqualität .....	7
1.2.1.2 Äqui-Effektdosen für die Vergleichbarkeit verschiedener Strahlenqualitäten.....	8
1.3 Genexpression nach Einwirkung von ionisierender Strahlung.....	9
1.3.1 Genexpression in Abhängigkeit von der Strahlenqualität .....	9
1.3.2 Genexpressionsbasierte Biodosimetrie.....	10
1.4 Biologische Endpunkte für das strahlenqualitätsrelevante Äqui-Effektdosen-Konzept	11
1.4.1 Induktion von $\gamma$ -H2AX Foci nach Exposition mit ionisierender Strahlung .....	11
1.4.2 Mikrokerninduktion nach Einwirkung von ionisierender Strahlung.....	12
1.4.3 Apoptose als Antwort auf ionisierende Strahlung.....	13
1.5 Ziele der Arbeit.....	15

<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
---------------------------------------	-----------

2.1 Materialien und Geräte .....	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Geräte.....	18
2.1.3 Software.....	20
2.1.4 Kits.....	20
2.1.5 Primer .....	21
2.1.6 Antikörper und Enzyme.....	22
2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	22
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Zelllinie und Zellkultur.....	22
2.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	23
2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	23
2.2.4 $\gamma$ -Bestrahlung.....	24

2.2.5 $\alpha$ -Bestrahlung .....	24
2.2.6 Exposition mit $^{123}\text{IdU}$ .....	25
2.2.6.1 Synthese von $^{123}\text{IdU}$ .....	25
2.2.6.2 Zellzyklus-Synchronisation und Inkubation mit $^{123}\text{IdU}$ .....	26
2.2.6.3 Radioaktivitätsbestimmung nach zellulären <i>Uptake</i> von $^{123}\text{IdU}$ .....	27
2.2.6.4 DNA- <i>Uptake</i> von $^{123}\text{IdU}$ .....	28
2.2.6.5 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns .....	28
2.2.6.6 Berechnung der totalen akkumulierten $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle .....	29
2.2.6.6.1 Aufnahmekinetik von $^{125}\text{IdU}$ für die Berechnung der totalen akkumulierten $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle .....	30
2.2.6.7 Berechnung der Zellkerndosis von $^{123}\text{IdU}$ .....	31
2.2.6.8 Zelluläre <i>Uptake</i> -Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$ .....	32
2.2.7 Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometrie.....	34
2.2.8 $\gamma$ -H2AX Analyse .....	35
2.2.8.1 Immunzytochemische Färbung von $\gamma$ -H2AX.....	36
2.2.8.2 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Foci mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.2.8.3 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Intensität mittels Durchflusszytometrie und die bivariate Analyse mit stufenweise angeordneten <i>Gates</i> .....	37
2.2.9 Der Mikrokern-Assay .....	37
2.2.10 Isolation der RNA.....	38
2.2.11 Microarrays.....	38
2.2.11.1 Durchführung der Microarrays .....	38
2.2.11.2 Microarray-Analyse.....	40
2.2.12 Quantitative real-time PCR .....	41
2.2.12.1 DNase-Behandlung.....	41
2.2.12.2 Durchführung der quantitativen real-time PCR.....	42
2.2.12.3 Überprüfung der Primerspezifität .....	43
2.2.12.3.1 Aufreinigung und Agarosegelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte .....	43
2.2.12.3.2 Sequenzierung der qRT-PCR-Produkte.....	44
2.2.13 Präparation der Metaphase-Platten für die Bestimmung des Ploidiegrades.....	45
2.3 Statistik .....	45
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1 Dosimetrische Betrachtung in Bezug auf die $^{123}\text{IdU}$ -Exposition .....	46
3.1.1 DNA-Aufnahme von $^{123}\text{IdU}$ .....	46
3.1.2 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns.....	47
3.1.3 Zelluläre Aufnahme-Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$ .....	48
3.2 Bestimmung der Mikrokerninduktion 24 h nach Exposition .....	51
3.3 $\gamma$ -H2AX Analyse .....	53

3.3.1 Mikroskopische Charakterisierung und Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX Foci 45 min nach Exposition .....	53
3.3.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Signalintensität 45 min nach Exposition.....	55
3.3.3 Quantifizierung und Verteilung der zellulären $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz mittels innovativer Durchflusszytometrieanalyse .....	56
3.4 Bestimmung der Apoptoseinduktion 24 h nach Exposition mittels Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assay .....	61
3.5 Bestimmung des Ploidiegrades in Jurkat-Zellen .....	62
3.6 Untersuchung der Genexpression nach Exposition mittels Microarrays.....	64
3.6.1 Bestimmung von Äqui-Effektdosen für die Microarray-Versuche .....	64
3.6.2 Signifikant veränderte Genexpressionen nach Exposition .....	65
3.6.3 Signifikant induzierte biologische Prozesse und Signalwege nach Exposition .....	67
3.6.3.1 Detaillierte Analyse der Nukleosomenorganisation und des Systemische Lupus erythematoses Signalwegs .....	70
3.7 Kandidatengene, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben .....	72
3.7.1 QRT-PCR der identifizierten Kandidatengene.....	74
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>83</b>
4.1 Dosimetrierelevante Ergebnisse in Bezug auf die $^{123}\text{IdU}$ -Exposition .....	83
4.1.1 DNA- <i>Uptake</i> von $^{123}\text{IdU}$ .....	83
4.1.2 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns bei Jurkat-Zellen.....	83
4.1.3 Zelluläre <i>Uptake</i> -Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$ .....	84
4.2. Mikrokerninduktion 24 h nach ionisierender Bestrahlung .....	85
4.3 $\gamma$ -H2AX Analyse .....	88
4.3.1 Charakterisierung und Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX Foci mittels Mikroskopie .....	88
4.3.2 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach Exposition mittels Durchflusszytometrie.....	92
4.3.3 Quantifizierung und Verteilung der zellulären $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz mittels innovativer Durchflusszytometrieanalyse .....	93
4.4 Apoptoseinduktion 24 h nach ionisierender Bestrahlung.....	95
4.5 Untersuchung des Ploidiegrades in Jurkat-Zellen .....	96
4.6 Genexpressionsuntersuchung nach Exposition mittels Microarrays .....	97
4.6.1 Äqui-Effektdosen für Microarray-Versuche .....	97
4.6.2 Veränderung der Genexpression nach Strahlenexposition.....	97
4.6.3 Induzierte biologische Prozesse und Signalwege nach Strahlenexposition .....	99
4.6.3.1 Die Nukleosomenorganisation und der Systemische Lupus erythematoses Signalweg .....	99
4.6.3.2 Die Apoptoseregulation.....	100
4.6.3.3 Die positive Regulation der DNA-Reparatur .....	102

---

4.6.3.4 Die negative Zellzyklusregulation .....	104
4.6.3.5 Steroidmetabolismus und -biosynthese .....	105
4.6.3.6 Die Antigenprozessierung und -präsentation .....	105
4.6.3.7 Die Regulation der Transkription .....	106
4.6.3.8 Die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion.....	107
4.6.3.9 Der Kalziumsignalweg .....	107
4.7 Identifizierung von Kandidatengenen, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben .....	108
4.7.1 Funktion und Strahlenrelevanz der Kandidatengenen, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben .....	108
4.7.1.1 Das Gen <i>KLF10</i> .....	108
4.7.1.2 Das Gen <i>TNFAIP8L1</i> .....	109
4.7.1.3 Das Gen <i>PPP1R14C</i> .....	110
4.7.1.4 Das Gen <i>DNAJC1</i> .....	111
4.7.1.5 Das Gen <i>PRTFDC1</i> .....	111
4.7.2 Vergleichende Analyse der identifizierten Gensignaturen mit bereits publizierten Microarray-Genexpressionsstudien .....	112
4.8 Vergleichende Analyse der Genexpression in Jurkat-Zellen und Lymphozyten nach $\gamma$ -Bestrahlung .....	116
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>119</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>136</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	136
7.2 Tabellenverzeichnis .....	137
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>141</b>
<b>9. Erklärungen .....</b>	<b>143</b>

## Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
AE	Auger-Elektronen
AEE	Auger-Elektronen-Emitter
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C <sub>t</sub>	<i>cycle threshold</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAPI	Diamidinphenylindol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and integrated Discovery</i>
dC	Deoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DISC	<i>death-inducing signal complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	<i>down</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Phosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESB	Einzelstrangbruch
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fötales Rinderserum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FdU	Fluorodesoxyuridin
FITC	Fluoresceinthiocyanat
G0-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	Erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
G2/M-Phase	Zweite <i>gap</i> -Phase und Mitose im Zellzyklus
Gy	Gray
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitzeschockproteine
IAEA	<i>International Atomic Energy Association</i>
IdU	Iododeoxyuridin



IR	Ionisierende Strahlung
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kg	Kilogramm
LET	Linearer Energietransfer
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute(n)
Mio	Million
mM	Millimolar
MMLV-RT	<i>murine leukemia virus</i> -Reverse Transkriptase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mSv	Millisievert
NaCl	Natriumchlorid
NTP	Nukleotidtriphosphat
PBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
pmol	Pikomol
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i> ,
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
Sv	Sievert
Tab.	Tabelle
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1. Einleitung

Die schnelle Abschätzung der individuellen Strahlendosis nach einem radiologischen Unfall oder einen terroristischen Anschlag, insbesondere wenn große Populationen betroffen sind, ist für die Bewertung des individuellen Strahlenrisikos sowie für die schnelle Einleitung einer adäquaten medizinischen Versorgung von großer Wichtigkeit [194].

Diese schnelle Abschätzung kann durch genexpressionsbasierte Biodosimetriemethoden erreicht werden, die es ermöglichen in kurzer Zeit sehr viele Proben zu analysieren. Diesbezüglich zeigten Microarray-Genexpressionsstudien nach Photonenbestrahlung von humanen peripheren Lymphozyten bereits eindrucklich, dass hinreichend kleine Gensignaturen identifiziert werden können, die eine Dosis-Antwort Beziehung zeigen und hierüber eine sehr genaue und zuverlässige Dosiszuordnung ermöglichen [19, 114, 165, 227].

Jedoch werden bei terroristischen Anschlägen und radiologischen Unfällen komplexe Strahlenfelder mit verschiedenen Strahlenqualitäten erzeugt. Da unterschiedliche Strahlenqualitäten bei gleicher Energiedosis häufig eine unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit haben [229], wäre die Identifizierung von Gensignaturen, die eine Diskriminierung von Strahlenqualitäten über die Genexpression erlauben, hilfreich und würde die Möglichkeiten der genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden, bei denen bisher nur Photonenbestrahlung angewendet werden, wesentlich erweitern. Solche Gensignaturen könnten zudem einen Hinweis auf qualitativ unterschiedliche Strahlenantworten auf zellulärer Ebene nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten geben.

Die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Strahlenqualität ist auf die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der verschiedenen Strahlenqualitäten zurückzuführen. Daher ist es essentiell, grundlegende Kenntnisse der physikalischen Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Strahlenqualitäten ( $\gamma$ -,  $\alpha$ -Strahlung und Auger-Elektronen-Emitter  $^{123}\text{I}$ ) darzustellen.

## 1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen

Durch die Wechselwirkung von ionisierender Strahlung (IR) mit Materie kommt es zur Anregung und Ionisation der Atome oder Moleküle, was zur Zerstörung chemischer Bindungen führen kann. Ein Maß für IR ist die Energiedosis (D), die als absorbierte Energiemenge pro Masseinheit definiert ist und in der Einheit Gray (Gy) angegeben wird, wobei  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/Kg}$  ist [182]. Die Menge an Energie, die pro Wegeinheit in der Materie deponiert wird, wird vom sogenannten linearen Energietransfer (LET) beschrieben und mit

der Einheit  $\text{keV}/\mu\text{m}$  definiert [64]. Somit ist der LET auch ein Maß für die Ionisationsdichte, die die Ionisationsereignisse pro Weeinheit angibt.

IR wird in unterschiedliche Strahlenqualitäten unterteilt. So gibt es Photonenstrahlung, zu der u. a. die  $\gamma$ -Strahlung zählt, und Partikelstrahlung, die auch als Teilchen- oder Korpuskularstrahlung bezeichnet wird und zu der beispielsweise  $\alpha$ -Strahlung gehört. Eine besondere Form der ionisierenden Strahlung stellen Auger-Elektronen-Emitter (AEE) dar.

### 1.1.1 $\gamma$ -Strahlung

$\gamma$ -Strahlung ist eine elektromagnetische Wellenstrahlung, die bei Atomkernreaktionen oder radioaktiver Umwandlung von Atomkernen entsteht. Die Ionisationsdichte von  $\gamma$ -Strahlung ist relativ niedrig, so dass sie zur Niedrig-LET Strahlung gezählt wird. Daher haben  $\gamma$ -Strahlen in Luft relativ große Reichweiten [64].

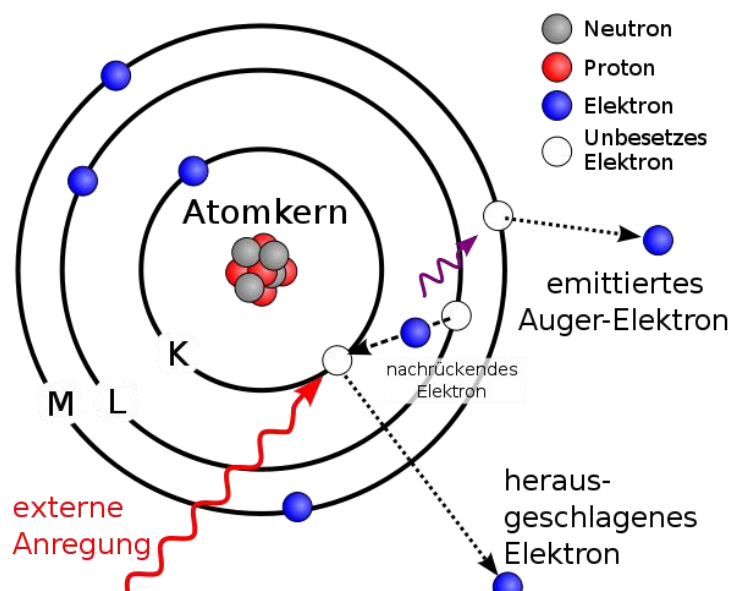
### 1.1.2 $\alpha$ -Strahlung

Bei der  $\alpha$ -Strahlung wird ein Heliumkern, bestehend aus 2 Protonen und 2 Neutronen, von einem Atomkern emittiert. Weil die Wechselwirkungen mit der Materie und somit auch die Ionisationsdichte von  $\alpha$ -Partikeln relativ hoch sind, wird  $\alpha$ -Strahlung der Hoch-LET Strahlung zugeordnet. Daher haben  $\alpha$ -Partikel in Luft relativ kurze Reichweiten [64].

### 1.1.3 Auger-Elektronen-Emitter

Auger-Elektronen-Emitter (AEE) zerfallen unter Emission von niederenergetischen Elektronen, die nach ihrem Entdecker Pierre Auger als Auger-Elektronen (AE) bezeichnet werden [9]. Durch Elektroneneinfang, innere Konversion oder durch die Bestrahlung von Nukliden mit niederenergetischen Photonen (photoelektrischer Effekt) kann in der Schale des Nuklids eine Vakanz entstehen, die durch den Übergang eines Elektrons aus einer höheren Schale aufgefüllt wird, wodurch wiederum eine Vakanz entsteht, die dann wiederum mit einem Elektron aus einer noch höheren Schale aufgefüllt wird. Dieser Vorgang kann sich mehrmals wiederholen (siehe Abb. 1). Die bei jedem Elektronenübergang freiwerdende Energie bewirkt die Emission eines charakteristischen Röntgenstrahl-Photons oder die Emission eines niederenergetischen Auger-, Coster-Kronig- bzw. Super-Coster-Kronig-Elektrons [42], die jedoch alle als AE bezeichnet werden. Demzufolge kann ein einzelner Zerfall eines Nuklids zur Emission einer Kaskade von bis zu 30 AE führen, wobei am Ende ein mehrfach ionisiertes Atom mit positiver Ladung übrig bleibt [105]. Dabei können die Energien der emittierten AE von wenigen eV bis zu ungefähr 100 keV variieren [105]. Die meisten der AE sind jedoch niederenergetisch mit Energien von  $\sim 20$ -500 eV und Reichweiten von ca. 1-10 nm in biologischer Materie [87]. Wenn demnach ein AEE zerfällt, wird ein

dichter „Schauer“ von niederenergetischen AE mit kurzer Reichweite emittiert, so dass demzufolge die meisten Ionisationsereignisse in einem extrem kleinen Volumen um das Nuklid herum stattfinden. Da somit auch sehr viel Energie in einem kleinen Volumen deponiert wird, wird die AE-Emission der Hoch-LET Strahlung zugeschrieben [11, 22, 106].



**Abb. 1: Schema des Auger-Effekts in Folge eines photoelektrischen Effekts.**  
Von Cepheiden [29]

Allerdings werden bei mikrodosimetrischen Analysen der AE-Emission sowohl eine Hoch- als auch eine Niedrig-LET Komponente betrachtet [20]. Jedoch hängt, wie unter 1.2.1 detaillierter erklärt wird, die biologische Wirkung der niederenergetischen AE stark von deren intrazellulären Lokalisation ab, so dass der Vergleich dieser mit der Hoch-LET Partikelstrahlung bezüglich der biologischen Wirksamkeit nicht unmittelbar gegeben ist.

#### Auger-Elektronen-Emitter $^{123}\text{I}$ :

Der AEE  $^{123}\text{I}$  hat eine Halbwertszeit von 13,2 h. Das Zerfallsschema von  $^{123}\text{I}$  ist relativ komplex, da der Elektronen-Einfang zu unterschiedlichen metastabilen  $^{123}\text{Te}$ -Zuständen führen kann (siehe Abb. 2 b). Das metastabile  $^{123}\text{Te}$ -Nuklid zerfällt mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 97% über das 159 keV-Niveau und anschließend über innere Konversion (16%) oder unter  $\gamma$ -Emission (84%) in den Grundzustand [172]. Die bei der inneren Konversion entstandene Vakanz kann zu einer Emission von mehreren niederenergetischen AE führen.

Bei Monte-Carlo-Simulationen, bei denen jeweils verschiedene Elektronen-Emissionsspektren zu Grunde lagen, wurden im Mittel 7,6 [172], 12,3 [89] bzw. 14,9 [86] AE pro  $^{123}\text{I}$ -Zerfall kalkuliert.

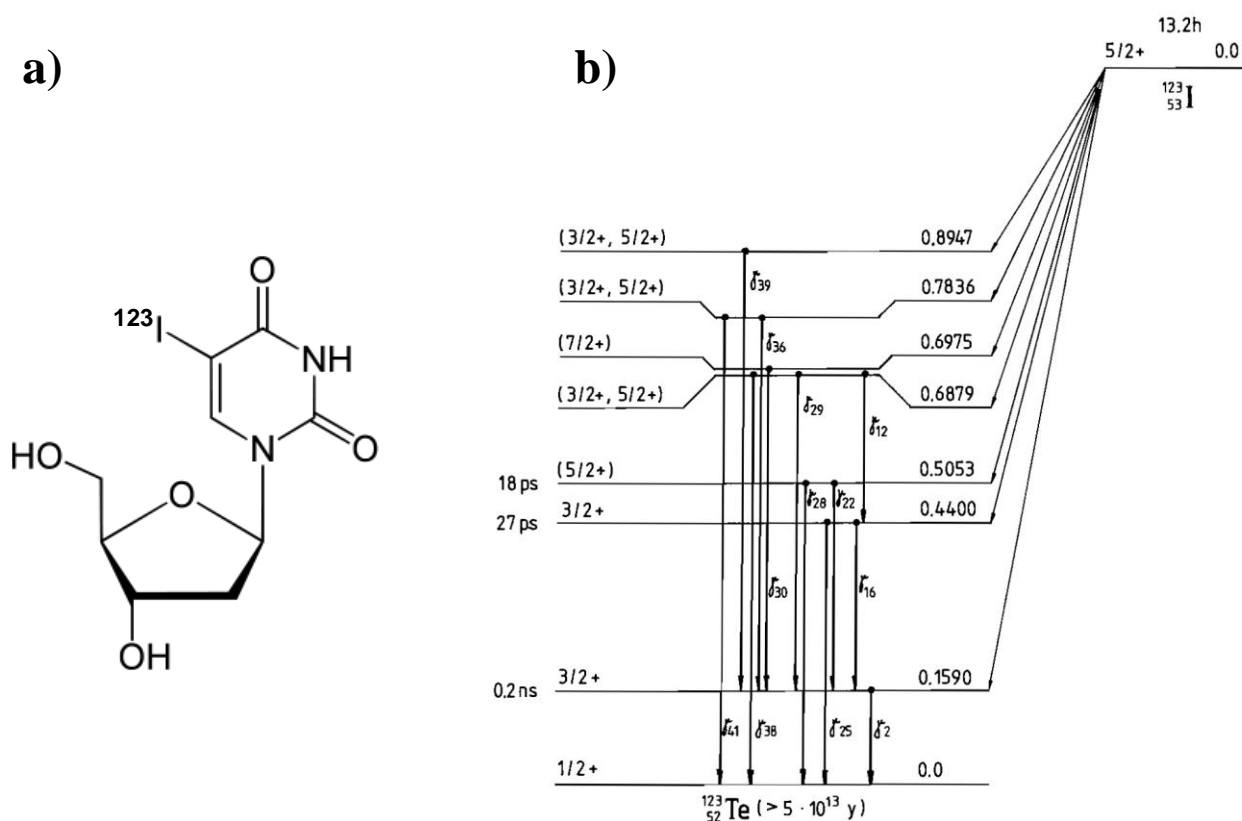


Abb. 2: Strukturformel von  $^{123}\text{I}$ Iododeoxyuridin (a; modifiziert von Yikrazuul [253]) und Zerfallsschema von  $^{123}\text{I}$  (b; von Pomplun [172]).

Der in dieser Arbeit verwendete AEE  $^{123}\text{I}$  wird in Form des Thymidinanalogs  $^{123}\text{I}$ Iododeoxyuridin ( $^{123}\text{IdU}$ ) während der S-Phase in die DNA eingebaut. Das Grundgerüst von  $^{123}\text{IdU}$  ist Thymidin, dessen Methylgruppe durch radioaktives Iod ersetzt wurde, wobei das Iodat in etwa dem Durchmesser der Methylgruppe entspricht (siehe Abb. 2 a).

## 1.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung auf zellulärer Ebene

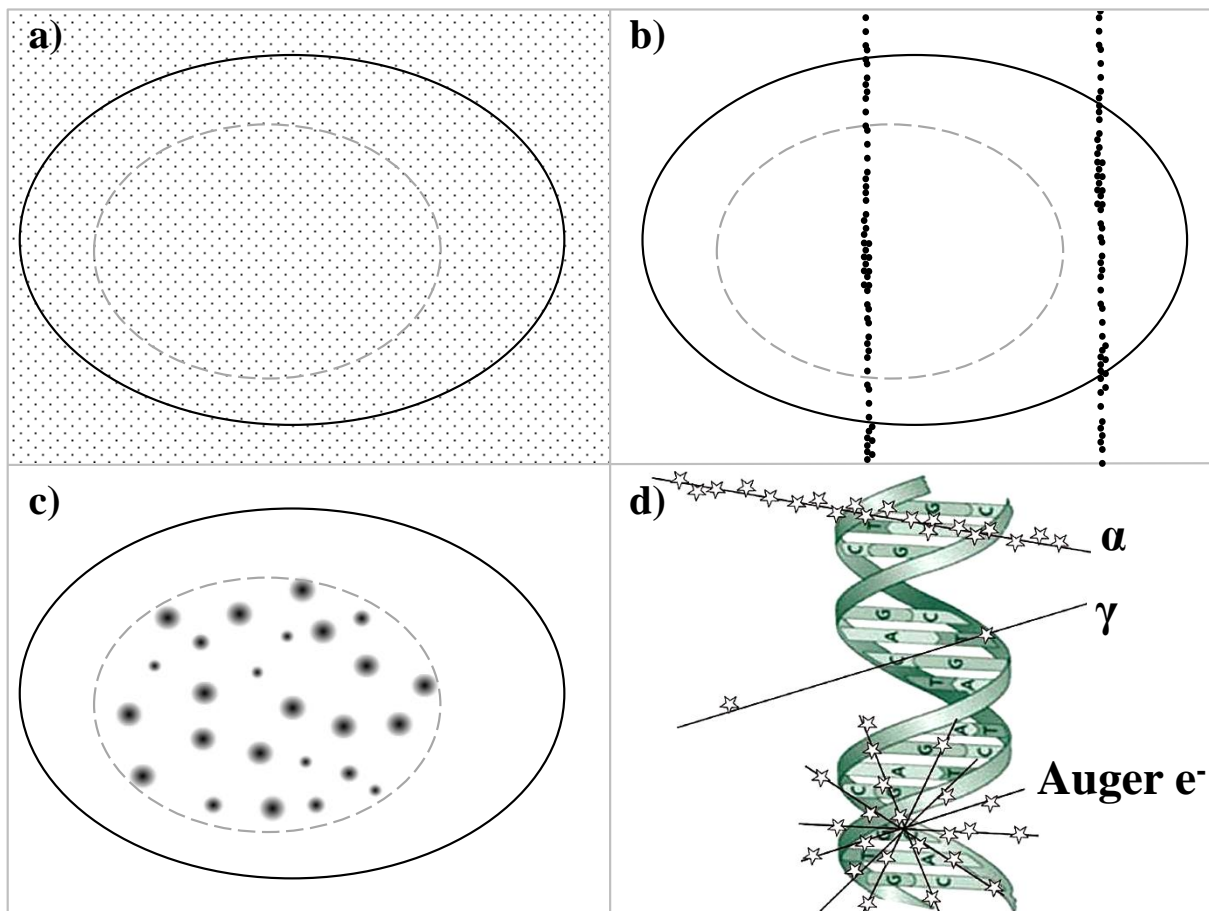
Die Wirkung ionisierender Strahlung auf zelluläre Moleküle und Strukturen haben je nach ihrer Bedeutung unterschiedliche Konsequenzen für die betroffene Zelle. Dabei sind Substrate und biochemische Verbindungen, die solitär bzw. in nur wenigen Duplikaten aktiv sind, bezüglich der Zellfunktionen strahlensensitiver als solche, die in vielen Kopien in der Zelle vorliegen. Zu den erst genannten gehört vor allem die DNA, die im Vergleich zu anderen zellulären Strukturkomponenten erhöht strahlenempfindlich ist [64].

Ionisierende Strahlung ist in der Lage, eine Vielzahl chemischer Verbindungen zu verändern, welches entweder auf direktem Wege erfolgen kann, d. h. die Ionisation erfolgt im betrachteten Molekül selbst, oder die chemische Änderung des Moleküls erfolgt auf indirektem Wege durch die Wirkung strahleninduzierter Radikale [76]. Da die Zelle zu etwa 80% aus Wasser besteht, spielt bei der indirekten Strahlenwirkung auf Moleküle v. a. die strahleninduzierte Hydrolyse von Wasser eine prominente Rolle [78]. Dabei werden aus den getroffenen Wassermoleküle zum größten Teil so genannte reaktive Sauerstoffverbindungen (*Reactive Oxygen Species*, ROS) gebildet [64]. Werden die ROS in einem kurzen Abstand zur DNA generiert, verursachen diese, aufgrund ihrer hohen Reaktivität und geringen Reichweite, eine Vielzahl von DNA-Schäden [157].

### 1.2.1 Strahlenqualitäten und deren unterschiedliche biologische Wirksamkeit

Unterschiedliche Strahlenqualitäten haben aufgrund ihrer unterschiedlichen LET bei gleicher Energiedosis häufig eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit. Oft hat Strahlung mit einem hohen LET eine größere biologische Wirksamkeit als solche mit einem niedrigen LET [229]. Um die biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlenqualitäten in Relation zueinander zu setzen, wurde die „Relative Biologische Wirksamkeit“ (*Relative Biological Effectiveness*, RBE) eingeführt. Der RBE-Wert ist definiert als der Quotient von zwei Dosen unterschiedlicher Strahlenqualitäten, die den gleichen Effekt unter gleichen Bedingungen am gleichen biologischen Objekt herbeiführen. Dabei stehen die Dosis der Referenzstrahlung ( $D_{\text{Ref}}$ ), meist Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlen, im Zähler des Quotienten und die Dosis der zu prüfenden Strahlung ( $D_x$ ) im Nenner ( $\text{RBE} = D_{\text{Ref}}/D_x$ ). Daher wurde die so genannte Äquivalentdosis, die eine auf die gleiche biologische Wirkung normierte Dosis darstellt, eingeführt. Die Äquivalentdosis einer Strahlenqualität ergibt sich aus deren Energiedosis multipliziert mit einem Qualitätsfaktor Q, der die relative biologische Wirksamkeit der betrachteten Strahlenqualität berücksichtigt [64]. Die Äquivalentdosis wird in Sievert (Sv) angegeben. Der Qualitätsfaktor Q hat für jede Strahlenqualität einen charakteristischen Wert. Beispielsweise wird für  $\alpha$ -Strahlung ein Qualitätsfaktor von 20 angegeben, während der von  $\gamma$ -Strahlung 1 beträgt [91]. Die Zuordnung eines Qualitätsfaktors für AEE ist schwierig, da die intrazelluläre Lokalisation des AEE eine enorme Rolle spielt. Daher liegt bezüglich der Bewertung von AEE momentan noch keine wissenschaftlich befriedigende Lösung vor [117]. Um die unterschiedlichen relativen biologischen Wirksamkeiten der verschiedenen Strahlenqualitäten zu verstehen, ist es notwendig die unterschiedliche strahlenqualitätsspezifische räumliche Verteilung der Energiedeposition darzustellen über die der LET nichts aussagt (siehe Abb. 3). Beispielsweise wird bei der Partikelstrahlung mit

einem hohem LET sehr viel Energie in einem kleinen Volumen entlang des Partikel-Tracks deponiert [69]. Daher werden besonders die Zellen bei der Partikelbestrahlung stark geschädigt, die von einem Partikel getroffen wurden, im Gegensatz zu den Zellen ohne Partikeltreffer. Hierbei zeigt sich eine für Hoch-LET charakteristische Poisson-Verteilung der Anzahl der Partikeltreffer pro Zelle bzw. pro Zellkern [56].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der räumlichen Verteilung der Energiedeposition von  $\gamma$ -Strahlung (a),  $\alpha$ -Strahlung (b) und eines DNA-assoziierten AEE (c) in Bezug auf eine Zelle inkl. Zellkern (a-c) bzw. auf die DNA (d; modifiziert von Sadeghi *et al.* [198]).

Demnach ist nachvollziehbar, dass v. a. bei geringen Dosen die resultierenden biologischen Effekte nach Partikelbestrahlung eher von der zellulären Trefferrate abhängig sind als von der berechneten durchschnittlichen Energie, die von den Zellen absorbiert wird [151].

Im Gegensatz zur Hoch-LET Partikelstrahlung ist die Energiedeposition der Niedrig-LET Photonenstrahlung zu mindestens im Hochdosisbereich relativ homogen verteilt (siehe Abb. 3) [83].

Beim AEE-Zerfall, bei dem ein dichter „Schauer“ von niederenergetischen AE mit kurzer Reichweite ihre Energie in einem extrem kleinen Volumen um das Nuklid herum abgeben, ist die Energiedeposition sehr inhomogen (siehe Abb. 3), so dass die biologische Wirkung von

AEE extrem von deren intrazellulärer Verteilung abhängt. Dementsprechend wurde bereits dokumentiert, dass DNA-assoziierte AEE Hoch-LET ähnliche biologische Effekte und exklusiv im Zytoplasma lokalisierte AEE Niedrig-LET ähnliche biologische Effekte zeigten [85, 179]. Daher ist eine dosimetrische Betrachtung nach AEE-Exposition im zellulären und subzellulären Maßstab, wie es in dieser Arbeit erfolgt, sinnvoll, um den Vergleich mit anderen Strahlenqualitäten über die absorbierte Strahlendosis zu ermöglichen. Bei DNA-assoziierten AEE, wie beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete  $^{123}\text{IdU}$ , ist daher die Bestimmung des Zell- bzw. Zellkernvolumens als Referenzvolumen für die Kalkulation der absorbierten Energiedosis unerlässlich [85, 104, 133].

Aufgrund der sehr kurzen Reichweite von niederenergetischen AE ist es für die Betrachtung der biologischen Wirkung von DNA-assoziierten AEE auf eine Zelle sinnvoll zu bestimmen, ob diese den AEE überhaupt aufgenommen hat. Da die biologische Wirkung des AEE auch abhängig von der intrazellulären Verteilung ist, sollte für eine aussagekräftige Dosimetrie zudem die DNA-Inkorporationsrate eines DNA-assoziierten AEE untersucht werden.

### 1.2.1.1 DNA-Schädigung in Abhängigkeit von der Strahlenqualität

Bestrahlte Zellen zeigen eine Reihe verschiedener Typen von DNA-Schäden. Die wichtigsten Schadenstypen sind Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB), AP-Stellen (Stellen in der DNA, die aufgrund eines DNA-Schadens weder Purine noch Pyrimidine enthalten), Basenschäden (irreversible Strukturveränderungen einer Base des DNA-Moleküls) und gehäufte bzw. komplexe DNA-Läsionen [76, 157, 178]. Gehäufte bzw. komplexe Läsionen bestehen aus zwei oder mehreren individuellen Läsionen auf beiden Strängen innerhalb einer oder zwei DNA-Helixdrehungen. Diese individuellen Läsionen können AP-Stellen, ESB, Basenschäden und DSB enthalten [7].

Ein einfacher DSB entsteht, wenn die beiden komplementären DNA-Stränge zur gleichen Zeit gebrochen sind und die Bruchstellen sich innerhalb von 10-20 Basenpaaren befinden, so dass die Basenpaarung und die Chromatinstruktur nicht in der Lage sind beide Stränge zusammenzuhalten [233].

Aufgrund der unterschiedlichen strahlenqualitätsspezifischen Energiedeposition unterscheiden sich die Strahlenqualitäten in ihrer Interaktion mit der DNA (siehe Abb. 3). Dabei zeigte sich, dass das Verhältnis zwischen ESB und DSB nach  $\alpha$ - bzw. Photonenbestrahlung 6:1 bzw. 25:1 ist [214]. Demnach induzieren dicht ionisierende  $\alpha$ -Partikel im Gegensatz zu locker ionisierenden Photonen verhältnismäßig mehr DSB als ESB. Dies ist von Bedeutung, da der DSB die kritischste Läsion für die DNA und somit auch für die Zelle darstellt [23, 96, 224]. Darüber hinaus induziert Hoch-LET Partikelstrahlung



vermehrt gehäufte bzw. komplexe DNA-Läsionen im Vergleich zu Niedrig-LET Photonenstrahlung [24, 99, 102, 158, 177], welches vermutlich die Ursache für die langsamere bzw. unvollständigere DSB-Reparatur nach Hoch-LET im Gegensatz zu Niedrig-LET Bestrahlung ist [188, 215, 221]. Schließlich ist es weitest gehend akzeptiert, dass die unterschiedliche strahlenqualitätsspezifische Energiedeposition, die erhöhte DSB-Induktion und Komplexität der DNA-Schädigung die verstärkte biologische Wirkung von Hoch-LET Partikelstrahlung gegenüber Niedrig-LET Photonenstrahlung erklärt.

Da beim AEE-Zerfall niederenergetische AE mit kurzer Reichweite emittiert werden, hängt die biologische Wirkung der AE stark von deren intrazellulären Lokalisation ab (siehe Abb. 3). So zeigen DNA-assoziierte AEE Hoch-LET ähnliche biologische Effekte während exklusiv im Zytoplasma lokalisierte AEE Niedrig-LET ähnliche biologische Effekte bewirken [85, 179]. Hierfür könnte vermutlich die Induktion von komplexen DNA-Läsionen nach dem Zerfall DNA-inkorporierter AEE verantwortlich sein, welches bereits in Computersimulationen für  $^{123}\text{IdU}$  bzw.  $^{125}\text{IdU}$  gezeigt wurde [173]. Dabei berechneten Pomplun *et al.* [173] mittels Monte-Carlo-Simulationen ein Elektronen-Energie-Spektrum für individuelle  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfälle und kalkultierten die Verteilung der komplexen DNA-Strangbruchmuster. Im Detail wurden dabei Wahrscheinlichkeiten von 0,151; 0,285; 0,176; 0,112 bzw. 0,175 berechnet, dass ein  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall innerhalb der DNA einen ESB, zwei oder mehrere ESB auf demselben Strang, zwei ESB auf gegenüberliegenden Strängen (innerhalb von 10 Basenpaaren), einen DSB, einen DSB plus einen ESB bzw. zwei oder mehrere DSB induziert [173].

Darüber hinaus muss ein zusätzlicher DNA-Schadensmechanismus beim Zerfall DNA-inkorporierter AEE betrachtet werden. Nachdem ein AEE mehrere AE emittiert, bleibt ein mehrfach ionisiertes Atom zurück, welches dann durch Elektronen aus der Umgebung neutralisiert wird. Im Falle des  $^{123}\text{IdU}$ -Moleküls wird diskutiert, ob das nach Emission der AE mehrfach ionisierte Iod-Atom durch eine sogenannte Coulomb-Explosion eine Fragmentierung des  $^{123}\text{IdU}$ -Moleküls bewirkt und möglicherweise so die DNA schädigt [120].

### 1.2.1.2 Äqui-Effektdosen für die Vergleichbarkeit verschiedener Strahlenqualitäten

Die biologische Strahlenwirkung verschiedener Strahlenqualitäten kann über die Energiedosis allein nicht beurteilt werden, da, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Strahlenqualitäten aufgrund ihrer unterschiedlichen LET und Energiedepositionsmuster bei gleicher Energiedosis eine unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit haben können [229].

Um beispielsweise bzgl. der Genexpression nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen und um geeignete Dosen für diese vergleichende Analyse zu identifizieren, ist es sinnvoll mit Hilfe von Dosiseffektkurven ausgewählter Endpunkte Äqui-Effektdosen zu identifizieren, die ähnliche Effekt-Level für die zu untersuchenden Strahlenqualitäten verursachen. Dieses Konzept der Äqui-Effektdosen wurde bereits bei mehreren Studien, die die Genexpression nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten untersuchten, angewendet [58, 136, 209, 210].

### 1.3 Genexpression nach Einwirkung von ionisierender Strahlung

Als Antwort auf eine strahleninduzierte DNA-Schädigung werden Signaltransduktionskaskaden induziert, bei denen Sensor-Proteine den DNA-Schaden detektieren und Transduktions-Proteine das Signal an Effektor-Proteine weiterleiten, die dann typische strahlenassoziierte Prozesse wie z. B. die DNA-Reparatur, den Zellzyklus, die Apoptose oder auch die Transkription bzw. die Genexpression regulieren können [257].

In mehreren Microarray-Studien, bei denen die Genexpression aller bzw. vieler Gene eines Genoms zum gleichen Zeitpunkt untersucht wurden, zeigte sich, dass die Genexpression nach ionisierender Bestrahlung stark reguliert wird. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Anzahl signifikant regulierter Gene in humanen Zellen nach Photonenbestrahlung [97, 114, 170], nach  $\alpha$ -Bestrahlung [33-35] bzw. nach  $^{125}\text{I}$ U-Exposition [211] dosisabhängig ansteigt. Zudem konnten Knops *et al.* [114] in humanen Lymphozyten nach  $\gamma$ -Bestrahlung zeigen, dass die Anzahl signifikant regulierter Gene, die an typischen strahlenassoziierten Prozessen wie z. B. Apoptose, Nukleosomenorganisation und Proteolyse beteiligt sind, dosisabhängig ansteigt. Des weiteren zeigten Microarray-Genexpressionsstudien in humanen Zellen, dass auch nach Partikelbestrahlung bzw. nach Exposition mit DNA-inkorporierten AEE typische strahlenassoziierte Prozesse wie z. B. Apoptose, DNA-Reparatur, Nukleosomenorganisation und der Zellzyklus auf Genexpressionsebene signifikant reguliert werden [51, 58, 136, 209].

#### 1.3.1 Genexpression in Abhängigkeit von der Strahlenqualität

Unterschiedliche Strahlenqualitäten haben aufgrund ihres unterschiedlichen LET und Energiedepositionsmusters bei gleicher Energiedosis häufig eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit [229], welches sich auch in Bezug auf die Genexpression zeigt. So konnten beispielsweise Danielsson *et al.* [51] in humanen Vorhautfibroblasten zeigen, dass nach  $\alpha$ -Bestrahlung ca. 2-mal mehr apoptoserelevante Gene signifikant reguliert waren als nach der 12-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung. Dem ähnlich wies Meador *et al.* [136] in humanen lymphoblastoiden Zellen nach, dass nach Bestrahlung mit Eisen-Ionen mehr Histongene

reguliert waren als nach der 1,5-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung. In Bezug auf DNA-assoziierte AEE zeigten Sokolov *et al.* [209], die humane Lungenfibroblasten mit  $^{125}\text{IdU}$  bzw. mit  $\gamma$ -Strahlung exponierten und dabei mit äqui-gentoxischen Dosen arbeiteten, dass nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung die Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur auf Genexpressionsebene signifikant reguliert waren.

So lässt sich diesbezüglich vermuten, dass möglicherweise bestimmte Gene in Abhängigkeit von der Strahlenqualität reguliert werden, so dass mit deren Hilfe Strahlenqualitäten voneinander diskriminiert werden könnten, welches ein Hauptziel dieser Arbeit darstellt. Bisher gibt es nur sehr wenige Microarray-Genexpressionsstudien, die überhaupt verschiedene Strahlenqualitäten miteinander vergleichen, um Gene zu identifizieren, mittels deren Strahlenqualitäten eindeutig voneinander diskriminiert werden könnten.

So zeigten beispielsweise Chauhan *et al.* [34] in humanen Keratinozyten, dass die Gene *CCNB2*, *NEK2* bzw. *BUB1*, *CDC20*, *AURKA*, die an der Zellzyklusregulation bzw. Mitose beteiligt sind, nach  $\alpha$ -Bestrahlung signifikant hochreguliert jedoch nach gleichen Strahlendosen  $\gamma$ -Bestrahlung nicht reguliert waren. Eine andere exemplarische Studie [121] wies in humanen mesenchymalen Stammzellen nach, dass die Gene *PIP5K1A*, *DDX17* und *AP1S1* nach Eisen-Ionen- bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung jeweils unterschiedliche strahlenqualitätsspezifische Antworten zeigten.

### 1.3.2 Genexpressionsbasierte Biodosimetrie

Die Abschätzung der individuellen Strahlendosis beispielsweise nach einem terroristischen Anschlag oder radiologischen Unfall ist für die Bewertung des individuellen Strahlenrisikos sowie für die schnelle Einleitung einer adäquaten medizinischen Versorgung von großer Wichtigkeit [194]. Derzeit werden bezüglich der Biodosimetrie vorwiegend zytogenetische Methoden angewendet, aber auch modernste Hochdurchsatzverfahren, die unter anderem die Untersuchung des Transkriptoms ermöglichen, sind für den Einsatz in der Biodosimetrie geeignet [161, 194]. Der Vorteil der genexpressionsbasierten Biodosimetrie gegenüber anderen biodosimetrischen Methoden ist die schnelle Abschätzung der Strahlendosis, insbesondere wenn große Populationen betroffen sind, wie sie zum Beispiel nach Reaktorunglücken oder nach der Freisetzung radioaktivem Materials durch Terroranschläge [194]. In Genexpressionsstudien wird dabei nach Markergenen gesucht, die eine lineare Dosis-Antwort Beziehung aufweisen, damit die für das jeweilige Gen detektierte Genexpression einer bestimmten Strahlendosis zugeordnet werden kann. In Microarray-Genexpressionsstudien, die die Untersuchung des gesamten Genoms erlauben, wurden nach Niedrig-LET Bestrahlung von humanen peripheren Lymphozyten hinreichend kleine

Gensignaturen identifiziert, die eine sehr genaue und zuverlässige Dosiszuordnung ermöglichen [19, 114, 165, 194].

### **1.4 Biologische Endpunkte für das strahlenqualitätsrelevante Äqui-Effektdosen-Konzept**

Der Hintergrund des Konzepts der Äqui-Effektdosen wurde bereits unter 1.2.1.2 erklärt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionen nach Exposition mit den drei Strahlenqualitäten in der vorliegenden Arbeit zu ermöglichen und um geeignete Dosen für diese vergleichende Analyse zu identifizieren, sollten drei biologische Endpunkte für die Bestimmung der Äqui-Effektdosen ausgewählt werden. Diesbezüglich wurden die Mikrokernbildung, die Bildung von  $\gamma$ -H2AX Foci sowie die Apoptoseinduktion als geeignet befunden, da bereits bei allen eine lineare Abhängigkeit zwischen Effekt und Dosis nach Photonenbestrahlung beschrieben und zudem eine Anwendung in der Biodosimetrie untersucht wurde [21, 32, 194, 235].

#### **1.4.1 Induktion von $\gamma$ -H2AX Foci nach Exposition mit ionisierender Strahlung**

Die DNA bildet in eukaryotischen Zellen zusammen mit speziellen Proteinen einen kompakten Komplex, der als Chromatin bezeichnet wird. Ein wichtiger Bestandteil des Chromatins ist das Nukleosom, ein Oktamer aus je zwei Histonen der Klassen H2A, H2B, H3 und H4, um welches sich ein etwa 147 bp langer DNA-Abschnitt wickelt [116, 155, 230]. Die Klasse der H2A-Histone wird in die Untergruppen H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX unterteilt, die jeweils charakteristische Aminosäure-Sequenzen enthalten [15].

Nach Induktion eines Doppelstrangbruchs (DSB) wird in Säugerzellen in der Umgebung des DSB das Histon H2AX an Serin 139 phosphoryliert, welches dann als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet wird [189]. Diese Phosphorylierung kann von den Enzymen ATM [25], ATR [238] und DNA-PK [163] katalysiert werden, wobei v. a. die Phosphorylierung durch ATM im Vordergrund steht. Dabei breitet sich die Phosphorylierung von H2AX in der unmittelbaren Umgebung des DSB radial aus, so dass schließlich H2AX-Histone phosphoryliert werden, die bis zu einigen Megabasen entfernt vom DSB lokalisiert sind [190]. Die Funktion der Bildung von  $\gamma$ -H2AX ist die Rekrutierung von Signal- und Reparaturfaktoren an den Ort der DNA-Schädigung [166]. Hierbei interagiert  $\gamma$ -H2AX u. a. mit BRCA1, RAD51, 53BP1, MDC1 und dem MRN-Komplex [16, 166, 216, 239].

Die Akkumulation von  $\gamma$ -H2AX in der Umgebung von DSB wird als Foci bezeichnet, die über entsprechende Antikörper immunzytochemisch nachweisbar sind [190] und somit als Biomarker für DNA-Schädigung dienen. Mehrere Studien zeigen eine lineare Abhängigkeit

zwischen der relativen  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz oder der Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci und der Dosis nach Niedrig-LET Bestrahlung [131, 132, 193], so dass u. a. auch eine Anwendung für die Biodosimetrie untersucht wurde [194].

Unterschiedliche Strahlenqualitäten haben in Abhängigkeit ihrer LET und Energiedepositionsmuster bei gleicher Energiedosis häufig unterschiedliche biologische Wirksamkeiten [229]. Dies zeigt sich auch nach Exposition mit Hoch-LET Partikelstrahlung bzw. Niedrig-LET Photonenstrahlung in Bezug auf die Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci. Diesbezüglich konnten in Säugerzellen nach Hoch-LET Partikelstrahlung größere [90] und/oder signalstärkere  $\gamma$ -H2AX Foci [43] nachgewiesen werden als nach Niedrig-LET Photonenstrahlung. Ibanez *et al.* [90] vermuteten, dass der Anstieg der Foci-Größe auf die stärkere Induktion gehäufte bzw. komplexer DNA-Läsionen nach Hoch-LET Bestrahlung im Vergleich zur Niedrig-LET Photonenstrahlung zurückzuführen sei, wie es vielfach in der Literatur beschrieben ist [24, 99, 158, 177].

Bisher konnten in humanen Zellen keine strahlenqualitätsspezifischen Unterschiede bezüglich Größe und Intensität der  $\gamma$ -H2AX Foci nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und dem DNA-assoziierten AEE  $^{125}\text{IdU}$  gezeigt werden [251].

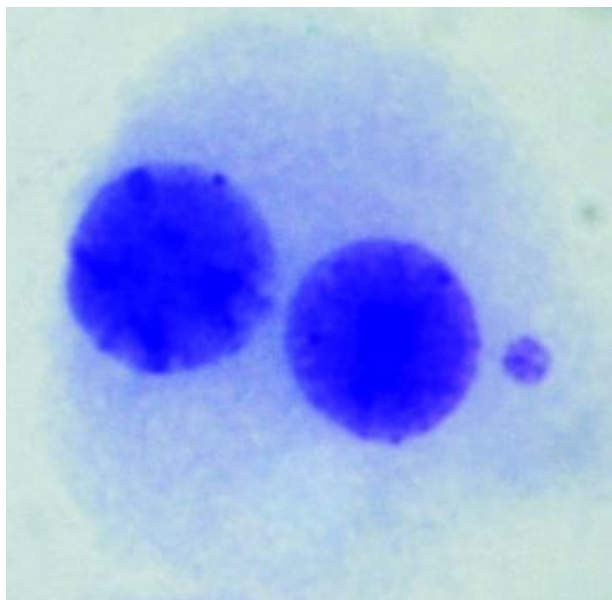
### 1.4.2 Mikrokerninduktion nach Einwirkung von ionisierender Strahlung

Der Mikrokern-Assay ist eine etablierte Methode, mit der chromosomale Schäden, die beispielsweise durch IR induziert wurden, quantifiziert werden können [217]. Mikrokern sind intrazelluläre Strukturen, die Chromatin enthalten, von einer eigenen Membran ohne Verbindung zum Zellkern umgeben sind und optisch als kleine, runde Partikel im Zytoplasma (Abb. 4) erscheinen [80, 202]. Mikrokern enthalten ganze Chromosomen (aneugener Effekt) oder Chromatinfragmente (klastogener Effekt). Nach chromosomaler Schädigung ohne Reparatur des Schadens erfolgt die Bildung von Mikrokernen innerhalb der Anaphase, indem die chromosomalen Fragmente bzw. Chromosomen nicht zum gegenüberliegenden Pol transportiert werden.

Beim Mikrokern-Assay kann Cytochalasin-B verwendet werden, welches in die Polymerisation der Aktinfilamente eingreift und so die zytoplasmatische Teilung verhindert, wobei binukleäre Zellen entstehen. Die Bestimmung der Mikrokernrate über binukleäre Zellen hat den Vorteil, dass nur teilungsfähige Zellen betrachtet werden. Mononukleäre Zellen werden nicht berücksichtigt, weil bei ihnen unklar ist, ob sie überhaupt noch teilungsfähig sind.

In Bezug auf ionisierende Strahlung zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Mikrokerninduktion und der Dosis nach Niedrig-LET Bestrahlung, so dass u. a. auch eine Anwendung des Mikrokern-Assays für die Biodosimetrie untersucht wurde [32, 235].

Bei gleicher Energiedosis haben unterschiedliche Strahlenqualitäten aufgrund ihrer unterschiedlichen LET und Energiedepositionsmuster häufig eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit [229]. Dementsprechend konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass die Mikrokernrate nach Hoch-LET Partikelstrahlung höher ist als nach Niedrig-LET Photonenstrahlung [18, 231, 248], welches möglicherweise darin begründet ist, dass die DSB-Reparatur nach Hoch-LET Bestrahlung langsamer und unvollständiger ist als nach Niedrig-LET Bestrahlung [188, 215, 221].



**Abb. 4: Darstellung einer binukleären Zelle mit Mikrokern.**

Die durch die Einwirkung von IR resultierenden Chromosomenaberrationen können nach der Karyokinese als Mikrokerne sichtbar werden. (aus Ionescu *et al.* [95])

Bezüglich der Exposition mit AEE konnten Kriehuber *et al.* [118] in humanen Zellen zeigen, dass der AEE  $^{65}\text{Zn}$ , der in der perinukleären Region der Zelle akkumulierte, eine höhere relative biologische Wirksamkeit zeigte als Röntgenstrahlen.

### 1.4.3 Apoptose als Antwort auf ionisierende Strahlung

Zellen in höheren Organismen können individuell auf Stressbedingungen, wie etwa irreparable DNA-Schädigung nach Einwirkung von IR, mit Apoptoseinduktion reagieren, um zu verhindern, dass sich geschädigtes bzw. fehlerhaftes Erbgut durch Mitose in den Tochterzellen manifestiert. Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose ist das Zellschrumpfen und die Chromatinaggregation mit genomischer Fragmentierung [110, 247]. Die Apoptose wird entweder rezeptorvermittelt [8] über den extrinsischen Signalweg oder

mitochondrial über den intrinsischen Signalweg [70] induziert, wobei das gemeinsame Ziel der beiden Signalwege die „downstream“ Aktivierung von Caspasen ist, die ihrerseits letztendlich den Zelltod einleiten [186].

Der extrinsische bzw. rezeptorvermittelte Signalweg wird durch die Bindung spezifischer Liganden an oberflächenlokalisierte Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie, die auch als Todesrezeptoren (z. B. CD95 oder TNF-Rezeptor Typ1) bekannt sind, aktiviert [149]. Wesentlicher Bestandteil dieser sogenannten Todesrezeptoren ist eine im Zytoplasma lokalisierte Todesdomäne. Nach Bindung des Liganden an den Todesrezeptor wird dessen Oligomerisierung bewirkt, wobei eine Struktur gebildet wird, an die sich verschiedene intrazelluläre Adaptermoleküle, die selbst eine Todesdomäne besitzen, anlagern können [81]. Unter anderem interagiert dabei auch FADD mit der Todesdomäne des Rezeptors, was die Rekrutierung der Caspase-8 und -10 zur zytoplasmatischen Todesdomäne des Rezeptors zur Folge hat [101]. Der als DISC (*death-inducing signal complex*) bezeichnete Komplex aus FADD und Caspase-8 bewirkt dann autokatalytisch die Aktivierung der Caspase-8, welche nachfolgend Caspase-3 aktiviert [197] und letztendlich zur Apoptose der Zelle führt.

Beim intrinsischen bzw. mitochondrial vermittelten Signalweg der Apoptose wird nach DNA-Schädigung P53 aktiviert. Wesentliche Zielgene für die nachfolgende P53-vermittelte transkriptionelle Hochregulation sind die proapoptotischen Gene *Bax*, *Noxa* und *Puma* [154, 181, 246], hingegen wird das anti-apoptotische Gen *BCL2* P53-vermittelt herunterreguliert [142, 143]. Noxa und Puma führen im Zusammenspiel mit Bax zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [246]. Zudem kann auch eine direkte Interaktion von P53 mit Bak eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirken [168]. Cytochrom C bildet dann zusammen mit APAF-1, dATP und Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom. Dieser Komplex führt zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-9 [259], welche dann ihrerseits die Caspasen-3 und -7 aktiviert und schließlich zur Apoptose der Zelle führt [197]. Erwähnenswert sei, dass die Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs durch ionisierende Strahlung über Caspase-9 auch P53-unabhängig erfolgen kann [145].

Nach Niedrig-LET Bestrahlung konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen Apoptoseinduktion und Dosis gezeigt werden, so dass eine Anwendung für die Biodosimetrie untersucht wurde [21, 32].

Unterschiedliche Strahlenqualitäten haben aufgrund ihrer unterschiedlichen LET und Energiedepositionsmuster bei gleicher Energiedosis häufig eine unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit [229]. Diesbezüglich konnte in humanen Leukämiezellen gezeigt werden, dass die Apoptoserate nach Hoch-LET Partikelstrahlung höher ist als nach gleichen

Dosen Niedrig-LET Photonenstrahlung [160, 231]. Eine Ursache für diesen erhöhten RBE gegenüber Niedrig-LET Bestrahlung könnte die langsamere bzw. unvollständigere DSB-Reparatur nach Hoch-LET Bestrahlung [188, 215, 221] sein, welches möglicherweise auf komplexere DNA-Schädigung nach Hoch-LET Bestrahlung zurückzuführen ist [24, 99, 102, 158, 177].

### 1.5 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu klären, ob mittels Genexpressionsanalysen Gene bzw. robuste Gensignaturen identifiziert werden können, mit deren Hilfe verschiedene Strahlenqualitäten voneinander zuverlässig diskriminiert werden können. Solche Gensignaturen wären einerseits ein Indiz auf qualitativ unterschiedliche Strahlenantworten auf zellulärer Ebene nach Hoch- und Niedrig-LET Exposition, andererseits würden sie die Möglichkeiten genexpressionsbasierter Biodosimetrie wesentlich erweitern.

Hierzu sollen Jurkat-Zellen mit drei verschiedenen Strahlenqualitäten ( $\gamma$ -Strahlung,  $\alpha$ -Strahlung und niederenergetische Auger-Elektronen) exponiert werden. Als Auger-Elektronen-Emitter (AEE) wird  $^{123}\text{I}$ ododeoxyuridin ( $^{123}\text{IdU}$ ) verwendet, da IdU als Thymidinanalogon direkt in die DNA eingebaut wird. Für die Niedrig-LET Exposition soll eine  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle und für die Hoch-LET Exposition eine  $^{241}\text{Am}$ -Flächenquelle verwendet werden.

Aufgrund der inhomogenen Energiedeposition bei Exposition mit niederenergetischen Auger Elektronen hängt die zelluläre Schädigung stark von der zellulären Lokalisation des AEE ab, wobei vielfach gezeigt wurde, dass DNA-assoziierte AEE die stärkste biologische Wirkung besitzen. Als weiteres Ziel soll deshalb die Dosimetrie von  $^{123}\text{IdU}$  im zellulären und subzellulären Maßstab optimiert werden, um den Vergleich der Strahlenqualitäten über die absorbierte Strahlendosis zu ermöglichen. Da  $^{123}\text{IdU}$  von der Zelle aufgenommen und in die DNA eingebaut wird, soll das Zell- und Kernvolumen von Jurkat-Zellen über 3-D Morphometrie ermittelt und die absorbierte Energiedosis berechnet werden. Zudem soll die zelluläre Aufnahme und Verteilung von  $^{123}\text{IdU}$  per Durchflusszytometrie bestimmt werden, um den Anteil von  $^{123}\text{IdU}$  gelabelten Zellen zu bestimmen. Da die biologische Wirkung des AEE auch abhängig von der intrazellulären Verteilung ist, soll zudem die DNA-Inkorporation von  $^{123}\text{IdU}$  mittels DNA-Extraktionsanalyse untersucht werden.

Um auszuschließen, dass in der humanen Lymphom-Zelllinie Jurkat eine Veränderung des Ploidiegrades nach vermehrter Zellteilung die Genexpressionsergebnisse beeinflusst, soll die Chromosomenanzahl pro Zelle in Abhängigkeit von der Zellpassage bestimmt werden.



Aufgrund der großen Inhomogenität der Energiedeposition bei niederenergetischen Auger Elektronen und  $\alpha$ -Strahlung soll mit Hilfe der Dosiseffektkurven für Mikrokernbildung, Apoptoseinduktion sowie der Bildung von  $\gamma$ -H2AX eine Dosiswirkungsabschätzung erfolgen, um hierüber Äqui-Effektdosen aller drei zu untersuchenden Strahlenqualitäten für die Genexpressionsstudien zu ermitteln.

Nach Exposition der Zellen mit Äqui-Effektdosen aller drei Strahlenqualitäten sollen Genexpressionsprofile erstellt und signifikant regulierte Signalwege bzw. biologische Prozesse identifiziert werden.

Schließlich sollen Kandidatengene identifiziert werden, die mittels Genexpressionsänderung die Diskriminierung der drei Strahlenqualitäten  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Strahlung und AEE-Exposition erlauben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<sup>125</sup> I-iododeoxyuridin	Perkin Elmer, Rodgau, Germany
7-Amino-Actinomycin D (7AAD)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichlorid	Fluka, München, Germany
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Casy <sup>®</sup> Ton	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
CellMask DeepRed	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Colzemid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cytochalasin-B	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Deoxycytidin (dC)	Fluka, München, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Dioxan	Fluka, München, Germany
dNTP-Mix, jeweils 25 mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Paschingen, Österreich
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fluorodeoxyuridin (FdU)	Fluka, München, Germany
Fötale Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
GeneRuler <sup>™</sup> 100 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hexamethylditin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hoechst33342	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Iododeoxyuridin (IdU)	Fluka, München, Germany

Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mounting-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodid (radioaktiv, Na <sup>123</sup> I)	Zyclotron AG, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland
Natriumzitat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies (dH <sub>2</sub> O)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Großbritannien
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
ProLong Goldantifade mit Diamidinphenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNase Zap	Applied Biosystems, Austin, USA
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
SytoxGreen	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Tris-Base	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Waschpuffer 1	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Waschpuffer 1	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Ziegenerum	PAA, Pasching, Österreich

### 2.1.2 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
<sup>137</sup> Cs- γ-Quelle	Gammacell 40, Atomic Energy Canada, Mississauga, Kanada
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agilent Technologies Microarray Scanner G2505 B	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Brutschrank Heraeus B 5061 (PTB)	Heraeus, Hanau, Deutschland

Brutschrank MCO-20 AIC	Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland
Casy <sup>®</sup> Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
ChemiDoc <sup>™</sup> XRS+	Bio-Rad, München, Deutschland
Curiemeter	PTW, Freiburg, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACS CANTO <sup>™</sup> II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Flash-Chromatograph	Axel Semrau, Sprockhövel, Germany
Fotoplatte BAS 2325	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Gamma-Counter 1480 Wizard <sup>™</sup> 3	Perkin Elmer, Rodgau, Germany
Gelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer; 0,1 mm)	Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Germany
Hybridisierungssofen	Sheldon Manufacturing, USA
Imaging System FLA-5000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Leica 63x/1,4 Plan-Apochromat Öobjektiv	Leica, Wetzlar, Germany
Leica DM 2500 Mikroskop	Leica, Wetzlar, Germany
Magnetrührer RCT basic IKAMAG <sup>®</sup>	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
MetaSystems-Auswertesystem	MetaSystems, Altlusheim, Germany
NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000 UV-VIS Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
POWER PAC 3000	Bio-Rad, München, Deutschland
Professional basic Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Rotofix 32A für Zytospin	Hettich, Tuttlingen, Germany
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallgerät Cell Disruptor B15	Branson, Danbury, USA
Zeiss 10x Plan-Apochromat Objektiv	Zeiss, Göttingen, Germany
Zeiss 63x/1,4 Plan-Apochromat Öobjektiv	Zeiss, Göttingen, Germany
Zeiss Axiovert 100 S Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Germany
Zeiss LD Achroplan 20x/0,40 Korr Ph2 Objektiv	Zeiss, Göttingen, Germany
Zeiss VivaTome Observer Z1 Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Germany
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Multifuge 1s-r  
 $\alpha$ -Bestrahlungssystem

Heraeus, Hanau, Deutschland  
 PTB, Braunschweig, Deutschland

### 2.1.3 Software

#### Software

#### Hersteller

2100 Expert Software

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

Agilent Scan Control Software

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

AxioVision System Software

Zeiss, Göttingen, Germany

BD FACSDiva Software

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Database for Annotation, Visualization and  
 Integrated Discovery 6.7 (DAVID)

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

Feature Extraction 9.5.1 Software

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

GeneSpring GX 7.3.1

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

Metafer 4 Metacyte Software

MetaSystems, Altlußheim, Germany

Microsoft Excel

Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

NCBI/ BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI/ Primer-BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Quantity One<sup>®</sup>

Bio-Rad, München, Deutschland

Sequence Detection Software 1.3.1

Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.4 Kits

#### Kit

#### Hersteller

Click-iT<sup>™</sup> EdU Flow Cytometry Assay Kit  
 (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 azide)

Invitrogen, Karlsruhe, Germany

DNeasy Blood & Tissue Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I

BD Pharmingen<sup>™</sup>, Heidelberg, Deutschland

Gene Expression Hybridization Kit

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

Low RNA Input Linear Amplification Kit  
 PLUS, One Color

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

Microarray Hybridization Chamber Kit

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

One-Color RNA Spike-In Kit

Agilent Technologies Deutschland GmbH,  
 Waldbronn, Deutschland

Power SYBR® Green RNA-to-C <sub>T</sub> <sup>TM</sup> 1-Step Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Assay Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Turbo DNA-free Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Whole Human Genome Microarray Kit, 4 x 44K G4112F	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland

### 2.1.5 Primer

Die Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form synthetisiert und in dem vom Hersteller angegebenen Volumen nukleasefreiem dH<sub>2</sub>O gelöst, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μl vorlagen.

**Tab. 1: Übersicht der verwendeten Primer**

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Produktlänge
<i>KLF10 Up</i>	AGCCAGCATCCTCAACTATCAGAAC	138 bp
<i>KLF10 Down</i>	ACATCTGCCACTGTGTTTCTCTCAC	
<i>PPP1R14C Up</i>	TGCAGACAGTGATGAAGAGAGAGCTT	122 bp
<i>PPP1R14C Down</i>	GGCTCAGTTTCCTCATGCCTCTTAT	
<i>GAPDH UP</i>	GTCAGCCGCATCTTCTTTTGC	149 bp
<i>GAPDH Down</i>	TGGCAACAATATCCACTTTACCAGAG	
<i>TNFAIP8L1 Up</i>	CACGAGATGCGGGCGATT	142 bp
<i>TNFAIP8L1 Down</i>	CACCCAAAATAACCTTCCTGACCTG	
<i>PRTFDC1 Up</i>	TGTCGGAAGTGGGAGGACCAT	123 bp
<i>PRTFDC1 Down</i>	TCAGGTCTAAAGCCGTCCTTCTGG	
<i>DNAJC1 Up</i>	CCGTGGACTCAAAATCAACAGAAACT	110 bp
<i>DNAJC1 Down</i>	TTGCTCTTGGACGGGACACA	
<i>VWF Up</i>	CCCCTGGGTACAAAGGAAGAAAATA	104 bp
<i>VWF Down</i>	TTCAGTGTCATGATCTGTCCTCCTC	
<i>SMPD1 Up</i>	TGAATCTGACCCAGGCAAACATAC	132 bp
<i>SMPD1 Down</i>	CCAGGCGGTAGGCAGTGTG	
<i>SNTB1 Up</i>	CCTGGTTGTGCTGACTGAGAAAGA	101 bp
<i>SNTB1 Down</i>	TGGCAAGAAGAGGGTATGTGTGAA	
<i>REEP1 Up</i>	TCCAGGCTGGTGGTGCTTATATTGG	141 bp
<i>REEP1 Down</i>	TGTCTCTGCTGTGGTGAAAAGTGCAA	

<i>FAM83D Up</i>	ATTGGGAAGGTTACGAAAAGTTCA	101 bp
<i>FAM83D Down</i>	TTACTGCTGTTTAATTTGCCATCCG	
<i>FAM57B Up</i>	AGATCCTCATCCAGTACAAGCAGCA	119 bp
<i>FAM57B Down</i>	GTAGGCCAGTACAGGTAGGGAAAG	

### 2.1.6 Antikörper und Enzyme

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Primärantikörper: anti-phospho-histone H2AX (Ser-139) mouse monoclonal Ab (mAb)	Millipore, Billerica, USA
Sekundärantikörper: FITC goat anti-mouse immunoglobulin G (H+L) highly cross-adsorbed	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
RNase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

### 2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
1,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24-Well-Zellkulturplatte	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Casy <sup>®</sup> Cups	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig, Germany
Dünnschichtchromatographie Kieselgel 60	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Filterpapier Zytospin	Hettich Zentrifugen, Germany
Kryoröhrchen	VWR, Darmstadt, Germany
MicroAmp <sup>™</sup> Optical 96-Well reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Germany
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zelllinie und Zellkultur

In dieser Arbeit wurde mit der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat gearbeitet, welche über die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig,

Deutschland) bezogen wurden. Die Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankt war, isoliert und etabliert [203]. In der vorliegenden Arbeit wurden Jurkat-Zellen verwendet, da diese den gleichen zellulären Ursprung haben wie humane Lymphozyten, die vorwiegend bei genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden verwendet werden [2, 5, 19, 113, 114, 165, 194]. Jurkat-Zellen haben allerdings gegenüber humanen Lymphozyten den Vorteil, dass diese proliferieren und somit den in dieser Arbeit verwendeten Auger-Elektronen-Emitters  $^{123}\text{I}$ iododeoxyuridin in die DNA einbauen.

Die Zellen wuchsen asynchron als Suspensionszellkultur in Vollmedium (RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% hitzeinaktivierten fötalen Rinderserum (FBS)). Die Zellen wurden in  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Vollmedium gewechselt und bei erhöhter Zelldichte wurden die Zellen gegebenenfalls passagiert. Dabei wurden ca. 2-4 Millionen Zellen in eine neue  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit 20 ml Vollmedium überführt.

### 2.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte mit dem CASY<sup>®</sup> Counter. Hierzu wurden 100  $\mu\text{l}$  der in RPMI 1640 resuspendierten Zellen mit 10 ml CASY<sup>®</sup> Ton in ein CASY<sup>®</sup> Cup gefüllt und anschließend die Messung durchgeführt. Dabei erfolgt unter anderem die Diskriminierung von vitalen und nicht-vitalen Zellen. Für weitere Versuche wurde nur die Zellzahl der vitalen Zellen berücksichtigt.

### 2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zunächst wurden die Zellen bei  $300 \times g$  für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühltem Einfriermedium (7,5% DMSO, 90% FBS) resuspendiert ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) und in Kryoröhrchen übergeführt. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden für 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und anschließend bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  langfristig kryokonserviert. Beim Auftauen der eingefrorenen Zellen wurden diese im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, in 10 ml  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Vollmedium aufgenommen und dann bei  $300 \times g$  für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde nun in 10 ml  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Vollmedium resuspendiert und für 10 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, damit DMSO Reste aus den Zellen diffundieren konnten. Nach erneuter Zentrifugation ( $300 \times g$  für 5 min bei RT) wurden die Zellen mit 5 ml  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Vollmedium resuspendiert und in einer  $25\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche ausgesät.



### 2.2.4 $\gamma$ -Bestrahlung

Die  $\gamma$ -Bestrahlung erfolgte mit einem  $^{137}\text{Cs}$ -Bestrahlungsgerät mit einer Dosisrate von  $0,71 \pm 0,018 \text{ Gy/min}$ . Die Zellen wurden mit Dosen von 0,2-20 Gy exponiert. Die Bestrahlungskammer wurde mit Wärmeakkus gewärmt. In jedem Versuch wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt.

### 2.2.5 $\alpha$ -Bestrahlung

Die  $\alpha$ -Bestrahlung wurde an der Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig durchgeführt. Das  $\alpha$ -Bestrahlungssystem der PTB besteht aus einer  $^{241}\text{Am}$  Quelle mit einer nominalen Aktivität von 195 kBq, die sich in einem rostfreien Stahl-Vakuum-System befindet. Die Öffnung des Stahl-Vakuum-Systems, durch die die  $\alpha$ -Partikel austreten, ist mit einer 2,5  $\mu\text{m}$  dicken Mylar-Folie versiegelt. Die Unterseite einer speziell angefertigten sterilen Bestrahlungskammer wird von einer 10  $\mu\text{m}$  Mylar-Folie gebildet [72]. Zwischen beiden Mylar-Folien befindet sich ein Sicherheitsabstand von 1 mm. Unter Einbeziehung des Energieverlustes auf dem Weg zu den Zellen beträgt die Energie der  $\alpha$ -Partikel ca. 3,35 MeV im Zentrum der Zellen. Der LET beträgt ca. 120 keV/ $\mu\text{m}$ .

**Tab. 2: Berechnete Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikeltreffern pro Jurkat-Zellkern [68] (Durchmesser = 10,8  $\mu\text{m}$ )**

Hit / Zellkern	0,1 Gy	0,2 Gy	0,5 Gy	1 Gy
0	0,62	0,38	0,10	0,01
1	0,30	0,37	0,23	0,05
2	0,07	0,18	0,27	0,11
3	0,01	0,06	0,20	0,16
4	0,00	0,01	0,12	0,19
5	0,00	0,00	0,05	0,17
6	0,00	0,00	0,02	0,13
7	0,00	0,00	0,01	0,09
8	0,00	0,00	0,00	0,05
9	0,00	0,00	0,00	0,03
10	0,00	0,00	0,00	0,01
Summe	1,00	1,00	1,00	1,00

Die Teilchenflussdichte beträgt  $1 \pm 0,15 \times 10^7 \text{ h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , welches einer Dosisrate von 1,92 Gy/h entspricht. Die Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikeltreffern pro Zellkern (Durchmesser 10,8  $\mu\text{m}$ ) wurden von Giesen [68] von der PTB für 0,1 Gy, 0,2 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy berechnet (Tab. 2). Die sterile Bestrahlungskammer wurde in ein vorher flammensterilisiertes Trägersystem eingespannt. Die Zellzahl wurde zuvor mit Hilfe eines Hämocytometers und eines Phasenkontrastmikroskops bestimmt. 80000 Zellen in 80  $\mu\text{l}$

Zellkulturmedium wurden in die Bestrahlungskammer appliziert, das gesamte Trägersystem mit einem flammensterilisierten Glasdeckel verschlossen und zum  $\alpha$ -Bestrahlungssystem transportiert. Bevor die Zellen in den Strahlengang der  $\alpha$ -Partikel geschoben wurden, wurde 3 min gewartet, damit sich alle Zellen auf der Mylar-Folie absetzen konnten. Das vollständige Absetzen der Zellen auf der Mylar-Folie innerhalb von 3 min wurde zu Beginn der Experimente mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 100 S) mit einem Zeiss LD Achroplan 20x/0,40 Korr Ph2 Objektiv überprüft. Dies stimmte sehr gut mit den Beobachtungen von Seideman *et al.* [206] überein, die Jurkat-Zellen mit einer  $^{241}\text{Americium}$  Quelle bestrahlten und ein vollständiges Absetzen der Zellen nach 5 min beobachteten. Das  $\alpha$ -Bestrahlungssystem wurde während der Bestrahlung durch eine 60 W Lampe auf ca. 37°C aufgeheizt. Die Zellen wurden mit Dosen von 0,1-1 Gy exponiert. In jedem Versuch wurden unbestrahlte Kontrollen mitgeführt. Nach Bestrahlung wurden die Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte transferiert und mit 240  $\mu\text{l}$  Vollmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank dann weiter kultiviert.

### 2.2.6 Exposition mit $^{123}\text{IdU}$

#### 2.2.6.1 Synthese von $^{123}\text{IdU}$

Da die Halbwertszeit von  $^{123}\text{I}$  nur ca. 13,2 h beträgt, musste  $^{123}\text{IdU}$  unmittelbar vor jedem Inkorporationsexperiment synthetisiert werden. Dies erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Baranowska-Kortylewicz *et al.* [12].

#### Synthese des Zwischenprodukts 5-(Trimethylstannyl)-2'-deoxyuridin:

In einem Dreihalskolben wurden 1,4 mmol 5-Iodo-2'-deoxyuridin (IdU) mit 45 ml wasserfreien Dioxan bei 60°C im Wasserbad unter ständigem Rühren gelöst. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und 6,1 mmol Hexamethylditin sowie 36 mmol Bis[triphenylphosphine]palladium(II)dichlorid als Katalysator wurden dazugegeben. Anschließend wurde die Lösung unter Rückfluss bei 112 °C für 4 h inkubiert, danach auf 40 °C abgekühlt und mittels Rotationsverdampfer evaporiert. Eine Kieselgelsäule wurde mit dem getrockneten Zwischenprodukt beladen und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (80:20, v/v) mittels Flash-Chromatographie gelöst, wobei die Flussrate bei 40 ml/min lag. Mehrere Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden gesammelt, gemischt und mittels Rotationsverdampfers auf 10 ml eingengt. 300  $\mu\text{l}$  der Vorfraktion wurden erneut über eine Kieselgelsäule mittels Flash-Chromatographie aufgetrennt. Je 1  $\mu\text{l}$  der neu aufgetrennten Fraktion des IdU-Standards sowie des 5-(Trimethylstannyl)-2'-

deoxyuridin-Standards wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) in einer Entwicklungskammer mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (80:20, v/v) aufgetrennt. Nach Trocknung konnte unter UV-Licht der Anteil an 5-(Trimethylstannyl)-2'-deoxyuridin in der neu aufgetrennten Fraktion überprüft werden. Erst wenn nachgewiesen wurde, dass sich in der Fraktion reines 5-(Trimethylstannyl)-2'-deoxyuridin befand, wurde die Fraktion mittels Rotationsverdampfers evaporiert.

Synthese von  $^{123}\text{IdU}$ :  $\text{Na}^{123}\text{I}$ , gelöst in 0,02 mol/l NaOH, wurde angeliefert. Die Reinheit bzw. die Aktivitätskonzentration des Nuklids lag bei 99,65% bzw. 37 GBq/ml. Zunächst wurde 100  $\mu\text{g}$  5-(Trimethylstannyl)-2'-deoxyuridin in 100  $\mu\text{l}$  Chloroform gelöst und 100 MBq  $\text{Na}^{123}\text{I}$  hinzugefügt. Danach wurde 5  $\mu\text{l}$  einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Essigsäure-Lösung (1:3, v/v) hinzugegeben. Das zweischichtige Gemisch wurde 10 s mit einem Ultraschallgerät behandelt, um die Austauschreaktion zu erleichtern. Bei der anschließenden Qualitätskontrolle der  $^{123}\text{IdU}$ -Synthese wurden je 1  $\mu\text{l}$  des IdU-Standards und des Syntheseproduktes mittels DC in einer Entwicklungskammer mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (80:20, v/v) aufgetrennt. Nach Trocknung wurde unter UV-Licht Anfang und Ende der Laufstrecke des IdU mit Bleistift gekennzeichnet und mit  $\text{Na}^{123}\text{I}$  markiert. Anschließend wurde die Folie auf einer Fotoplatte für 5 min im Dunkeln inkubiert und mittels Imaging System gescannt. Stimmt die Laufstrecke des Syntheseprodukts und die des IdU-Standards überein, war die  $^{123}\text{IdU}$ -Synthese erfolgreich. Im Anschluss daran wurde die wässrige Phase abgenommen, die Chloroformphase unter  $\text{N}_2$ -Zufuhr eingedampft und das verbliebene  $^{123}\text{IdU}$  mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gelöst. Die Radioaktivität der Lösung wurde mit einem Curiemeter bestimmt.

### 2.2.6.2 Zellzyklus-Synchronisation und Inkubation mit $^{123}\text{IdU}$

Um den zellulären *Uptake* des Thymidinanalogs  $^{123}\text{IdU}$  zu maximieren, wurde der Zellzyklus der Zellen mit Aphidicolin synchronisiert. Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpen und hemmt reversibel die DNA-Replikation, indem die DNA-Polymerase  $\alpha$  und  $\delta$  außer Funktion gesetzt wird, wodurch die Zellen in der frühen S-Phase synchronisiert werden. Die Zellen (0,5 Mio/ml) wurden 24 h mit 1,5-3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aphidicolin kultiviert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Ein Waschschriff beinhaltet jeweils die Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 300 x g und RT sowie die Resuspension der Zellen mit PBS. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 37 °C warmen Vollmedium rekultiviert, die Zellkonzentration lag hierbei bei 0,3 Mio/ml. Um potentielle zyto- und gentoxische Effekte, hervorgerufen durch Aphidicolin, zu reduzieren, wurde den Zellen ca. 12 h Zeit gegeben, die S- und G2/M-Phase zu absolvieren. Erst beim zweiten Eintritt in die S-Phase wurden die Zellen mit  $^{123}\text{IdU}$  inkubiert. Die Zellzyklus-Progression wurde dabei mittels Durchflusszytometrie überprüft. Im

Detail wurden 0,5 Mio Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml eiskalten 70%igen Ethanol für 15 min bei -20 °C fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und mit 5 µl 7-Amino-Actinomycin D (7AAD, Emissionsmaximum bei 647 nm) angefärbt. Nachfolgend wurde der Zellzyklus der Zellen mittels *BD FACSDiva Software* des Durchflusszytometers *BD FACS CANTO™ II*, ausgestattet mit einem 488 nm Laser, analysiert. Dabei wurde der Debris durch ein adäquates *Gate* in einem *Dotplot* von *Forward Scatter* versus *Side Scatter* ausgeschlossen. Dubletten wurden durch ein *Dotplot* von 7AAD-Fluoreszenz *Area* versus *Width* ausgeschlossen. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen gemessen.

Wenn die Zellen sich kurz vor Eintritt in die zweite S-Phase befanden, wurden diese mit 0,5-50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  für 20 h inkubiert. Um den DNA-*Uptake* von  $^{123}\text{IdU}$  zu maximieren, wurden die Zellen dabei zusätzlich mit 0,01 µM Fluorodeoxyuridin (FdU) und 0,01 µM Deoxycytidin (dC) kultiviert. Fluorodeoxyuridin inhibiert die zelluläre Synthese von Thymidin und Cytidin. Deoxycytidin wurde hinzugefügt, um die durch FdU gehemmte Synthese von Cytidin zu kompensieren. Nach dem Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  wurden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Für alle Experimente wurden unbestrahlte Kontrollen parallel nach dem identischen Protokoll mitgeführt, nur dass das radioaktive  $^{123}\text{IdU}$  mit 0,05-0,1 µM IdU ausgetauscht wurde.

### Puls-Labeling mit $^{123}\text{IdU}$ für die $\gamma$ -H2AX Versuche:

Da während der 20-stündigen Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  eine vermehrte DNA-Reparatur nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ein kurzzeitiges Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  durchgeführt. Somit wurde eine verbesserte Vergleichbarkeit mit der  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition erreicht, da es sich hierbei auch um Kurzzeitexpositionen handelte.

Für das Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  wurden die Zellen synchronisiert (siehe 2.2.6.2). Die Zellzyklus-Progression wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe oberhalb). Zu dem Zeitpunkt, bei dem die meisten Zellen sich in der S-Phase befanden, wurden die Zellen mit 0,2-50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  für 1 h inkubiert. Um eine Dosisakkumulation zu ermöglichen, wurden die Zellen anschließend für 4 Monate kryokonserviert, anschließend aufgetaut und für die  $\gamma$ -H2AX Analyse verwendet.

### **2.2.6.3 Radioaktivitätsbestimmung nach zellulären *Uptake* von $^{123}\text{IdU}$**

Nach Inkubation mit  $^{123}\text{IdU}$  wurden 100 µl Zellsuspension entnommen und bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Radioaktivität des Pellets sowie die des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen. Um

die Radioaktivität pro Zelle zu bestimmen, wurde gleichzeitig die Zellzahl bestimmt. Anschließend konnten die totalen akkumulierten Zerfälle pro Zelle kalkuliert werden.

### 2.2.6.4 DNA-Uptake von $^{123}\text{IdU}$

Für die Versuche wurden die Zellen synchronisiert und mit 1, 5 und 50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  für 20 h bzw. mit 1 und 30 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  für 1 h (Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$ ) kultiviert (siehe 2.2.6.2). Danach wurden 0,4 Mio Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (300 x g für 5 min bei RT). Die DNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels *DNeasy Blood & Tissue Kit*. Zusätzlich wurde der optionale Schritt, das Isolat für 2 min bei 37 °C mit RNase (2,5 mg/ml) zu behandeln, um RNA-freie genomische DNA zu erhalten, durchgeführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde der DNA-Elution-Schritt dreimal mit jeweils 180 µl nukleasefreiem dH<sub>2</sub>O wiederholt, um die Ausbeute der DNA-Isolation zu maximieren. Die Radioaktivitäten der vor der DNA-Extraktion eingesetzten Zellen sowie die der DNA-Extrakte wurden in einem Gamma-Counter gemessen. Anschließend wurden die totalen akkumulierten Zerfälle pro Zelle berechnet (siehe 2.2.6.6). Aus dem Quotienten beider Werte wurde der prozentuale Anteil des DNA-inkorporierten  $^{123}\text{IdU}$  berechnet.

### 2.2.6.5 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns

1 Mio asynchrone Zellen wurden zentrifugiert (300 x g für 5 min bei RT) und mit 1 ml des Plasmamembran-Farbstoffs CellMask DeepRed (5 µg/ml in PBS) für 15 min bei 37 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 4%iger Paraformaldehydlösung für 20 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und 50 µl dieser Zellsuspension wurde 1:1 mit dem Mounting-Medium ProLong Goldantifade mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) bei RT gemixt. 30 µl dieser Lösung wurden luftblasenfrei auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Analyse erfolgte an einem Zeiss VivaTome Observer Z1 Mikroskop mit einem Zeiss 63x/1,4 Plan-Apochromat Ölobjektiv. Mit dem VivaTome- Mikroskop können optische Schnitte mit einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit erstellt werden. Das VivaTome-Mikroskop basiert auf dem Prinzip der Aperturkorrelation, welches die Geschwindigkeit einer Spinning Disk mit der Lichteffizienz einer strukturierten Beleuchtung kombiniert, um mit einer konventionellen Weißlichtquelle 3D-Fluoreszenzaufnahmen durchführen zu können.

In Bezug auf die Volumenberechnung wurden 32 asynchrone Zellen vermessen. Dabei wurden mehrere optische Schnitte mit einer Tiefe von 1 µm aufgenommen. Die Berechnung

der Fläche eines optischen Schnittes erfolgte mit der *AxioVision system software* von Zeiss. Das Volumen eines optischen Schnittes wurde aus der Fläche  $\times 1 \mu\text{m}$  berechnet. Durch Aufsummierung der Volumina aller optischen Schnitte konnte das Gesamtvolumen des Zellkerns bzw. der Zelle berechnet werden.

#### 2.2.6.6 Berechnung der totalen akkumulierten $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle

Die Berechnung der akkumulierten Zerfälle pro Zelle in den Inkorporationsversuchen mit  $^{123}\text{IdU}$  basierten auf einem von Dr. Kümmerle (Forschungszentrums Jülich) speziell entwickelten mathematischen Rechenprogrammes. Dabei handelt es sich um ein rekursives Verfahren, bei dem ein neuer Wert aus dem vorhergehenden berechnet wird. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte der Berechnung angegeben.

##### 1. Festlegung der Zeit-Intervalle mit Abständen von 0,25 h

Als erstes wurde die Reihe der Zeit-Intervalle festgelegt. Diese Reihe begann mit 0 am Beginn der Inkorporation, gefolgt von Intervallen mit Abständen von 0,25 h.

$$t(i) = \begin{cases} 0 & \text{wenn } \text{Beginn}_{\text{Ink}} \\ t(i-1) + 0,25 & \text{wenn } \neq \text{Beginn}_{\text{Ink}} \end{cases}$$

$\text{Beginn}_{\text{Ink}}$  = Beginn der Inkorporation  
 $t(i)$  = Zeit nach  $\text{Beginn}_{\text{Ink}}$  im Intervall(i)

##### 2. Aufnahmekoeffizient, der die Aufnahmekinetik von $^{123}\text{IdU}$ berücksichtigt

Für die Berechnung der akkumulierten Zerfälle pro Zelle wurde die Aufnahmekinetik von  $^{125}\text{IdU}$  berücksichtigt (siehe 2.2.6.6.1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass bis ca. 7 h nach Expositionsbeginn eine nahezu lineare Aktivitätsaufnahme und danach eine Sättigung, ohne Aufnahme jeglicher weiterer Aktivität, stattfanden. Daher wurde ein Aufnahmekoeffizient berechnet, der in der Berechnung der akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle berücksichtigt wurde.

$$K_{\text{Aufn}}(i) = \begin{cases} 0 & \text{wenn } t(i) = 0 \\ 1 & \text{wenn } t(i) \geq 7 \\ \frac{t(i)}{7} & \text{wenn } t(i) < 7 \end{cases}$$

$K_{\text{Aufn}}(i)$  = Aufnahmekoeffizient im Intervall(i)

##### 3. Festlegung des Startwerts der akkumulierten Zerfälle zum Zeitpunkt $t(i) = 0$

$$Z_{\text{Akk}}(i = 0) = 0$$

$Z_{\text{Akk}}(i)$  = akkumulierte Zerfälle im Intervall(i)

4. Vorschrift für die Berechnung der akkumulierten Zerfälle, bei dem ein neuer Wert aus dem vorhergehenden berechnet wird

$$Z_{\text{Akk}}(i) = Z_{\text{Akk}}(i-1) + \text{Intervalldauer} * \text{mittlere Aktivität im Zeit-Intervall } (i-1, i)$$

$$Z_{\text{Akk}}(i) = Z_{\text{Akk}}(i-1) + (t(i) - t(i-1)) * \frac{A(i) + A(i-1)}{2}$$

Dabei wurde die Aktivität im Intervall(i), unter Berücksichtigung der gemessenen Aktivität des Zellpellets nach der 20-stündigen Inkorporation mit  $^{123}\text{IdU}$ , folgendermaßen berechnet:

$$A(i) = A_0 * K_{\text{Aufn}}(i) * 2^{\frac{20-t(i)}{T_{1/2}}}$$

$A(i)$ = Aktivität im Intervall(i)

$A_0$ = gemessene aufgenommene Aktivität nach 20-stündiger Inkorporation mit  $^{123}\text{IdU}$

$K_{\text{Aufn}}(i)$  = Aufnahmekoeffizient im Intervall(i)

20= Inkorporationsdauer mit  $^{123}\text{IdU}$  von 20 h

$T_{1/2}$ = Halbwertszeit

Daraus ergab sich folgende Formel:

$$Z_{\text{Akk}}(i) = Z_{\text{Akk}}(i-1) + 0,25 * 3600 * \frac{A_0 * K_{\text{Aufn}}(i) * 2^{\frac{20-t(i)}{T_{1/2}}} + A_0 * K_{\text{Aufn}}(i-1) * 2^{\frac{20-t(i-1)}{T_{1/2}}}}{2}$$

Zusätzlich wurde für jeden Versuch die Zellzahl bestimmt, so dass die akkumulierten Zerfälle pro Zelle errechnet werden konnten.

**2.2.6.6.1 Aufnahmekinetik von  $^{125}\text{IdU}$  für die Berechnung der totalen akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle**

Für die Berechnung der akkumulierten Zerfälle innerhalb der Expositionszeit von 20 h war es notwendig eine Aufnahmekinetik von  $^{123}\text{IdU}$  in synchronisierten Zellen zu erstellen. Da jedoch die Berechnung der Radioaktivität aufgrund der kurzen Halbwertszeit von  $^{123}\text{I}$  schwierig war, wurde  $^{123}\text{IdU}$  mit  $^{125}\text{IdU}$  ersetzt, welches eine Halbwertszeit von 60 d hat. Es wurde angenommen, dass die Aufnahmekinetik von  $^{125}\text{IdU}$  mit der von  $^{123}\text{IdU}$  bei gleicher Expositionszeit vergleichbar ist. Für die Versuche wurden die Zellen, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, synchronisiert und mit 1 kBq/ml bzw. 50 kBq/ml  $^{125}\text{IdU}$  kultiviert. Über einen Zeitraum von 20 h wurde stündlich 100 µl der Zellsuspension entnommen und bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Radioaktivität des Pellets sowie die des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen

(Abb. 5). Die Aufnahmekinetiken von  $^{125}\text{IdU}$  in synchronisierten Zellen wiesen bis ca. 7 h nach Expositionsbeginn eine nahezu lineare Aktivitätsaufnahme auf (Abb. 5).

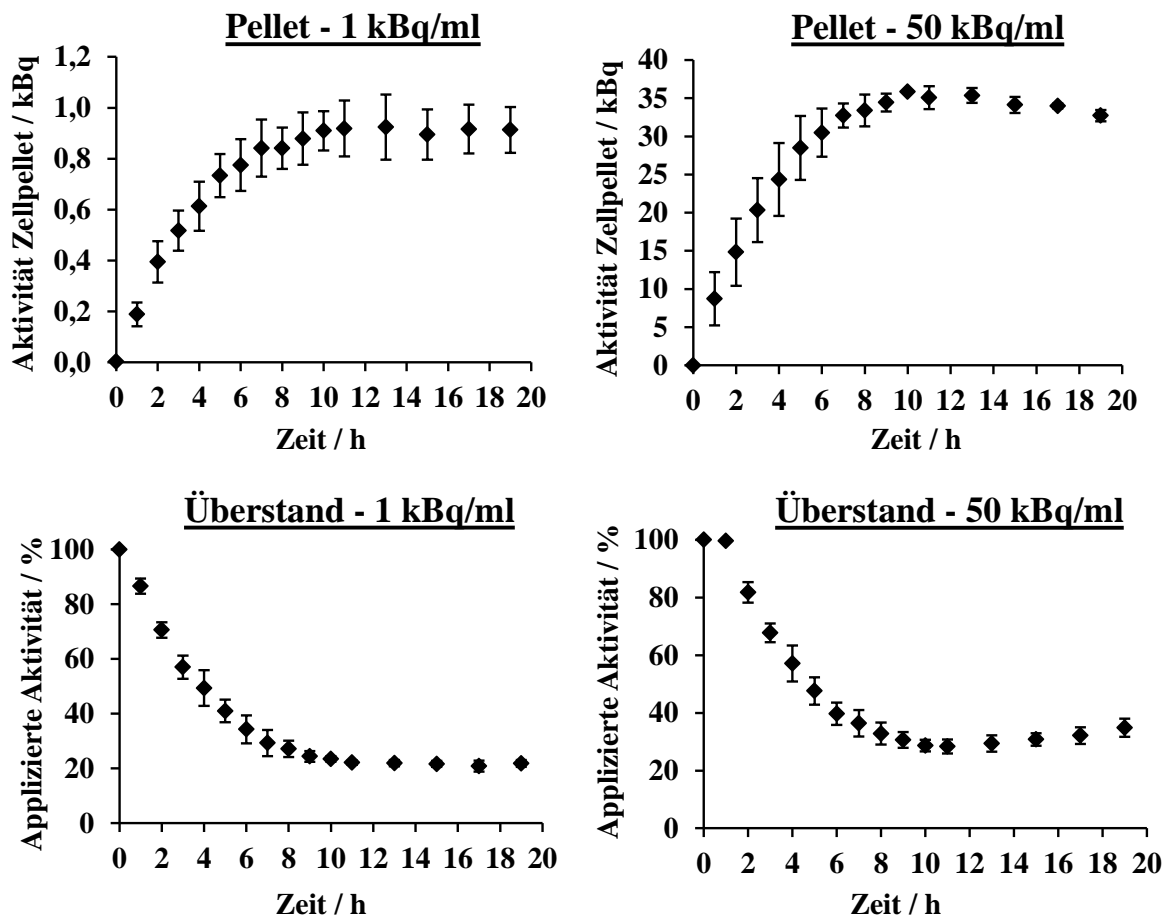


Abb. 5: Aufnahmekinetik von  $^{125}\text{IdU}$ .

Danach lief die Kurve in eine Sättigung, ohne Aufnahme jeglicher weiterer Aktivität. Die Abnahme von  $^{125}\text{IdU}$  im Zellkulturüberstand war dabei umgekehrt proportional zur Aufnahme in die Zelle.

#### 2.2.6.7 Berechnung der Zellkerndosis von $^{123}\text{IdU}$

Die Berechnung der Energiedosis erfolgte von Dr. Pomplun (Forschungszentrum Jülich [174]). Mittels Monte-Carlo-Methode wurden 10000 individuelle  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle per Computer simuliert und daraus ein mittleres Emissionsspektrum aus Auger-, Shake-off- und Konversionselektronen generiert. Ausgehend von diesem Elektronen-Energie-Spektrum konnte mit sogenannten „Point Kernels“ die Energiedeposition in der Umgebung des zerfallenden  $^{123}\text{I}$ -Nuklides als Funktion des Abstandes vom Zerfallsort und der Anfangsenergie berechnet werden. Unter der Annahme einer Gleichverteilung der  $^{123}\text{I}$ -Nuklide innerhalb eines Kugelvolumens (als geometrisches Modell für eine Zelle bzw. einen



Zellkern) ergaben sich die in Abbildung 6 aufgetragenen Werte für die im Mittel pro  $^{123}\text{I}$ -Zerfall deponierte Energie in Abhängigkeit vom Kugeldurchmesser. Der charakteristische Verlauf der Energiedepositionskurve resultiert aus den Besonderheiten des Emissionsspektrums für  $^{123}\text{I}$  mit im Mittel 7,5 emittierten Elektronen pro Zerfall mit Energien zwischen wenigen eV und etwa 160 keV [175].

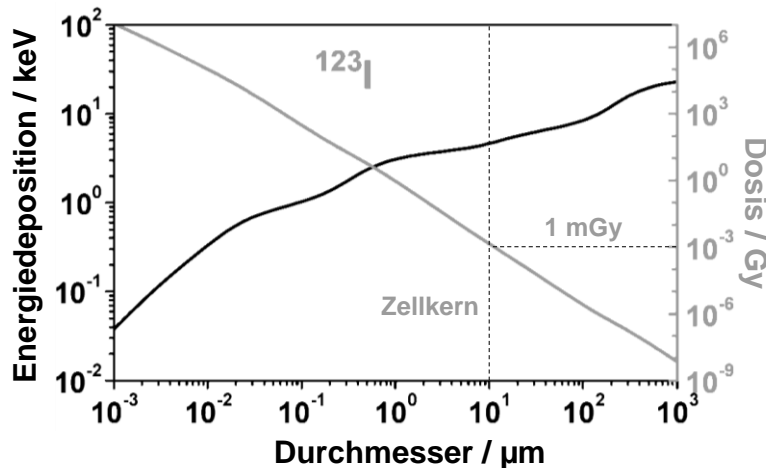


Abb. 6: Energiedeposition und Dosis nach Zerfall von gleichverteilten  $^{123}\text{I}$ -Nukliden in Abhängigkeit vom Durchmesser des Targets (modifiziert von Pomplun [174]).

Da die DNA-Uptake Versuche zeigten, dass 88% der im Zellpellet gemessenen  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität in der DNA lokalisiert war (siehe 3.1.1), wurde der Zellkern als relevantes Target ausgewählt. Daraufhin wurde für die Dosisberechnung die Anzahl der akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle nachfolgend mit dem Faktor 0,88 korrigiert, da nur 88% der im Zellpellet gemessenen  $^{123}\text{IdU}$  Aktivität in der DNA lokalisiert war. Dementsprechend wurden für die  $\gamma$ -H2AX Versuche, bei denen das Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  zur Anwendung kam, mit dem Faktor 0,7 korrigiert. Bei einem Zellkern-Durchmesser von 10,8  $\mu\text{m}$  wurde pro  $^{123}\text{I}$ -Zerfall eine Dosis von 1 mGy kalkuliert [174] (siehe Abb. 6). Die Dosis, die beim  $^{123}\text{I}$ -Zerfall durch Photonen bzw. hochenergetische Konversionselektronen entstand, ist bezogen auf die Dosimetrie vernachlässigbar (persönliche Mitteilung von Dr. Pomplun und [133]).

Die in dieser Arbeit verwendete dosimetrische Betrachtung von  $^{123}\text{IdU}$  ist fortschrittlich, da in dieser das Zellkernvolumen, die zelluläre Aufnahme von  $^{123}\text{IdU}$  und die Inkorporation in die DNA mit betrachtet werden. Zwar stellt diese  $^{123}\text{IdU}$ -Dosimetrie eine Annäherung an die Realität dar, bleibt aber in Grenzen auch spekulativ.

#### 2.2.6.8 Zelluläre Uptake-Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$

Die Bestimmung der zellulären Uptake-Rate erfolgte mittels Co-Labeling der Zellen mit  $^{123}\text{IdU}$  und dem Proliferationsmarker bzw. Thymidinanalogon EdU (Ethynyldeoxyuridin) und

anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Die Durchflusszytometrie-Methode wird unter 2.2.7 erklärt.

Für die Versuche wurden die Zellen, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, synchronisiert und mit 1, 5, 50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  und simultan mit 0,2  $\mu\text{M}$  EdU (*Click-iT™ EdU Flow Cytometry Assay Kit*) für 20 h kultiviert. Während der zwanzigstündigen Inkubation wurden alle 5 h ein Teil der Zellen fixiert. Dabei wurden  $10^6$  Zellen zunächst zentrifugiert (5 min bei 300 x g und RT), mit 1 ml 1% BSA in PBS gewaschen und zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) für 20 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit 1 ml 1% BSA in PBS gewaschen, wobei auf jeden Waschschriff eine 5-minütige Zentrifugation bei 300 x g und RT folgte. Die Permeabilisierung und EdU-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 647 (Emissionsmaximum bei 647 nm) der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls des *Click-iT™ EdU Flow Cytometry Assay Kits*.

### **SSB-Puffer (SytoxGreen Staining Buffer)**

300 mM NaCl

30 mM Natriumzitat

0,1 % Triton-X-100

Anschließend erfolgte die Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff SytoxGreen (Emissionsmaximum bei 523 nm). Dabei wurden die Zellen zunächst bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und mit 1 ml SSB-Puffer gewaschen. Da SytoxGreen auch RNA anfärbt, wurden die Zellen für 10 min bei 37 °C mit 1 ml RNase-Lösung (0,2 mg/ml in SSB-Puffer) behandelt. Danach wurden die Zellen bei zentrifugiert und mit 0,4 ml SytoxGreen-Lösung (0,1  $\mu\text{M}$  in SSB-Puffer) resuspendiert und angefärbt. Dann erfolgte die durchflusszytometrische Messung mittels *BD FACSDiva Software* im *BD FACS CANTO™ II* Durchflusszytometer, ausgestattet mit einem 488 nm Laser. Der Debris wurde durch ein adäquates *Gate* in einem *Dotplot* von *Forward Scatter* versus *Side Scatter* ausgeschlossen. Dubletten wurden durch ein *Dotplot* von SytoxGreen Fluoreszenz *Area* versus *Width* ausgeschlossen. Die EdU-Fluoreszenz wurde gegen die SytoxGreen-Fluoreszenz kompensiert, um die Spektralüberlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle zu berechnen. Um die EdU-Intensität als Funktion des DNA-Gehalts auszuwerten, wurde in einem *Dotplot* die EdU-Fluoreszenz gegen die SytoxGreen-Fluoreszenz aufgetragen. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Ein *Dotplot* der Kontrollzellen wurde genutzt, um *Gates* zu setzen, um den Anteil der EdU-gelabelten Zellen u. a. auch zellzyklusabhängig zu quantifizieren. Die Radioaktivität pro Zelle wurde 20 h nach Co-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$ /EdU bestimmt und die

totalen akkumulierten Zerfälle pro Zelle wurden berechnet. Um zu überprüfen, welchen Einfluss EdU auf die  $^{123}\text{IdU}$ -Aufnahme hat, wurden parallel zum Co-Labeling mit  $^{123}\text{IdU/EdU}$  Versuche ohne EdU durchgeführt und miteinander verglichen.

### 2.2.7 Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometrie

Um die Apoptoseinduktion in nicht-fixierten Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen, wurde der Annexin V-FITC/ Propidiumiodid-Assay angewendet. Der Assay basiert darauf, dass bei apoptotischen Zellen das Phosphatidylserin, das bei nicht-apoptotischen Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert. Bei dieser Methode bindet FITC-markiertes Annexin V hochspezifisch an Phosphatidylserin und kann durchflusszytometrisch quantifiziert werden, wobei das FITC-Emissionsmaximum im grünen Spektralbereich bei 520 nm liegt. Aufgrund der Permeabilität der Zellmembran spät-apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen diffundiert das Annexin V-FITC in diese Zellen und färbt diese ebenfalls an. Um früh- und spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen voneinander diskriminieren zu können, werden die Zellen zusätzlich mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt, welcher nur in spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen kann. Das Emissionsmaximum von PI liegt im roten Spektralbereich bei 617 nm.

24 h nach Exposition mit den verschiedenen Strahlenqualitäten erfolgte die Anfärbung mit Annexin V-FITC/PI mittels FITC Annexin V *Apoptosis Detection Kit I*. Dabei wurden zunächst 0,1-1 Mio Zellen für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und danach zweimal mit kaltem PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet mit Bindungspuffer resuspendiert (1 Mio Zellen/ml). Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension (0,1 Mio Zellen) mit 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl PI für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach mit 200 µl Bindungspuffer aufgefüllt. Innerhalb 1 h erfolgte nun die durchflusszytometrische Messung im Durchflusszytometer. Da eine durchflusszytometrische Messung in der PTB Braunschweig, in der die  $\alpha$ -Bestrahlung stattfand, nicht möglich war, wurden diese Proben an der 15 min entfernten DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig an einem *BD FACSCalibur™* gemessen. Die Zellen, die mit  $\gamma$ -Strahlung und  $^{123}\text{IdU}$  exponiert wurden, wurden mit dem *BD FACS CANTO™ II* analysiert. Sowohl die Daten der *BD FACSCalibur™*-Messung als auch die der *FACS CANTO™ II*-Messung wurden mittels *BD FACSDiva Software* ausgewertet. Der Debris wurde durch ein adäquates *Gate* in einem *Dotplot* von *Forward Scatter* versus *Side Scatter* ausgeschlossen. Die FITC-Fluoreszenz wurde gegen die PI-Fluoreszenz kompensiert, um die Spektralüberlagerung der

beiden Fluoreszenzkanäle zu berechnen. Dies erfolgte automatisch mittels *BD FACSDiva Software* unter Verwendung einer ungefärbten, FITC-gefärbten und PI-gefärbten Probe. In einem *Dotplot* mit logarithmischen Skalen wurde die FITC- gegen die PI-Fluoreszenz dargestellt. Über entsprechende *Gates* wurden Annexin V-FITC- und PI-negative vitale Zellen, Annexin V-FITC-positive und PI-negative früh-apoptotische Zellen und Annexin V-FITC- und PI-positive spät-apoptotische/ nekrotische Zellen quantifiziert. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen gemessen.

### Durchflusszytometrie:

Diese Methode stellt ein optisches Messsystem für einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel, dar. In der biologischen Anwendung sind dies in der Regel Zellen. Verschiedene Komponenten der Zelle werden mit Fluorochromen oder Fluorochromgekoppelten „Antikörpern“ angefärbt. Das Fluoreszenzlicht und die Streulichteigenschaften der gemessenen Partikel werden qualitativ und quantitativ mittels empfindlicher Lichtdetektoren gemessen. Vorteil dieser Methode ist die simultane und sehr schnelle Messung mehrerer Parameter, z.B. der relativen Zellgröße, Granularität oder dem Vorhandensein von Oberflächenantigenen. So können mehrere tausend Zellen in kurzer Zeit gemessen werden, was statistische Aussagen über die gemessenen Parameter stark erhöht.

Zur Analyse werden die Zellen mit der sie umgebenen Flüssigkeit stark beschleunigt. Es kommt zur hydrodynamischen Fokussierung, der Auftrennung von kleineren Zellaggregaten und zur Hintereinanderreihung der Zellen. Wenn ein von einem Laser fokussierter Lichtstrahl auf eine durchströmende Zelle trifft, werden die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale mit speziellen Spiegel- und Filtersystemen auf verschiedene *Photo Amplifier* geleitet. Die Stärke der Streuung ist dabei von der Querschnittsfläche der Zelle, der Membranstruktur und Granularität abhängig. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) korreliert direkt mit der Zellgröße. Ein kleiner Teil des Lichts streut seitwärts und wird als Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) bezeichnet, das Aussagen über die intrazelluläre Granularität erlaubt.

### **2.2.8 $\gamma$ -H2AX Analyse**

Nach Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSB) durch ionisierende Strahlung wird in der Umgebung des DSB das Histon H2AX an Serin 139 phosphoryliert, welches als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet wird [189], über entsprechende Antikörper immunzytochemisch nachweisbar ist [190] und somit als Biomarker für DNA-Schädigung dient.

### 2.2.8.1 Immunzytochemische Färbung von $\gamma$ -H2AX

45 min nach Exposition mit den verschiedenen Strahlenqualitäten wurden die Zellen zweimal mit PBS (1 Mio Zellen/ml) gewaschen und zentrifugiert (300 x g für 5 min bei RT). Ein Waschschriff beinhaltet nachfolgend das Waschen mit dem entsprechenden Puffer sowie der Zentrifugation der Zellen bei 300 x g für 5 min bei RT. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd, gelöst in PBS, für 20 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Plasmamembran der Zellen erfolgte mit der Detergens 1% Triton-X-100, gelöst in PBS, für 20 min bei RT. Danach wurden die Zellen mit TBP-Puffer (1% BSA, 0,2% Triton-X-100, gelöst in PBS) gewaschen und anschließend mit 7,5% Ziegen Serum in PBS für 1 h bei RT geblockt, welches die unspezifische Bindung der Antikörper an Proteine reduziert. Dann wurden die Zellen mit TBP-Puffer gewaschen und mit dem Primärantikörper (siehe 2.1.6, 1:700 in TBP) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TBP-Puffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (siehe 2.1.6, 1:700 in TBP) für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Letztendlich wurden die Zellen zweimal mit TBP-Puffer gewaschen, mit TBP-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C eingelagert. Die  $\gamma$ -H2AX Quantifizierung erfolgte einerseits mittels Fluoreszenzmikroskopie und andererseits per Durchflusszytometrie, wie nachfolgend beschrieben.

### 2.2.8.2 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Foci mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ca. 30.000  $\gamma$ -H2AX-gefärbte Zellen wurden per Zytospin bei 300 x g für 5 min bei RT auf einen Objektträger aufgebracht. Mit Hilfe eines Zytospins können Zellen als Einschnittpräparat auf einen definierten zentralen Bereich eines Objektträgers zentrifugiert werden. Die Restflüssigkeit wird dabei durch ein Filterpapier aufgesaugt. Nach dem Trocknen der Zellen wurden diese mit dem *Mounting*-Medium ProLong Goldantifade mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2500) mit einem Leica 63x/1,4 Plan-Apochromat Ölobjektiv analysiert. Die  $\gamma$ -H2AX Foci wurden per Auge evaluiert und quantifiziert. Ein gut definierter Focus wurde als einzelner Focus gewertet, auch wenn dieser andere Foci berührte. Ein *Cluster* aus Foci, bei dem einzelne Foci nicht klar definiert waren, wurde als ein Focus gezählt. Für jede Probe wurden 100-200 Zellen ausgezählt.

### 2.2.8.3 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Intensität mittels Durchflusszytometrie und die bivariate Analyse mit stufenweise angeordneten *Gates*

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde bereits unter 2.2.7 erläutert. Ca. 100.000  $\gamma$ -H2AX-gefärbte (FITC) Zellen wurden mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff 7AAD (1:30, Emissionsmaximum bei 647 nm) versetzt. Die Proben wurden mittels *BD FACSDiva Software* des Durchflusszytometers *BD FACS CANTO<sup>TM</sup> II*, ausgestattet mit einem 488 nm Laser, analysiert. Der Debris wurde durch ein adäquates *Gate* in einem *Dotplot* von *Forward Scatter* versus *Side Scatter* ausgeschlossen. Dubletten wurden durch ein *Dotplot* von 7AAD-Fluoreszenz *Area* versus *Width* ausgeschlossen. Sub-G1-Zellen, unter denen häufig apoptotische Zellen zu finden sind [153], in denen H2AX induziert wird [191], wurden durch ein Histogramm der 7AAD-Fluoreszenz ausgeschlossen. Die FITC-Fluoreszenz (Emissionsmaximum bei 520 nm) wurde gegen die 7AAD-Fluoreszenz kompensiert, um die Spektralüberlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle zu berechnen. Dies erfolgte automatisch mittels *BD FACSDiva Software* unter Verwendung einer ungefärbten, FITC-gefärbten und 7AAD-gefärbten Probe. Um die  $\gamma$ -H2AX Intensität als Funktion des DNA-Gehalts auszuwerten, wurde in einem *Dotplot* die FITC-Fluoreszenz, auf einer logarithmischen Skala, gegen die 7AAD-Fluoreszenz, auf einer linearen Skala, aufgetragen. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Mittels *BD FACSDiva Software* wurden Median-Werte der  $\gamma$ -H2AX-Fluoreszenz für jede Probe und für jede Strahlenqualität bestimmt. Für jede Strahlenqualität wurden diese Median-Werte relativ zur jeweiligen Kontrolle berechnet, welches den Vergleich der Strahlenqualitäten untereinander erlaubte. Die innovative Durchflusszytometrieanalyse mit stufenweise angeordneten *Gates* wird unter 3.3.3. erklärt.

### 2.2.9 Der Mikrokern-Assay

Der Mikrokern-Assay ist eine Methode mit der chromosomale Schäden, die beispielsweise durch ionisierende Strahlung induziert wurden, quantifiziert werden können. Beim Mikrokern-Assay wurde Cytochalasin-B verwendet, welches in die Polymerisation der Aktinfilamente eingreift und so die zytoplasmatische Teilung verhindert, wobei binukleäre Zellen entstehen. Die Bestimmung der Mikrokernrate über diese binukleären Zellen hat den Vorteil, dass nur teilungsfähige Zellen betrachtet werden. Mononukleäre Zellen werden nicht berücksichtigt, weil bei ihnen unklar ist, ob sie überhaupt noch teilungsfähig sind.

Kurz nach Exposition mit den verschiedenen Strahlenqualitäten wurden die Zellen für 24 h mit 1,25  $\mu$ g/ml Cytochalasin-B kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und mit eiskalter hypotonischer KCl-Lösung (75 mM) vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die

Behandlung mit der hypotonischen KCl-Lösung quellen die Zellen auf, so dass sich die Mikrokerne optisch besser von den Zellkernen diskriminieren lassen. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und vorsichtig mit eiskaltem Methanol/ Eisessig (3:1, v/v) resuspendiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert. Nun wurden ca. 30 µl der fixierten Zellen auf einen Objektträger aufgeschliert und bei RT getrocknet. Nach ein-minütiger Inkubation der Objektträger mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (1 µg/ml) wurden diese zweimal für jeweils 1 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Trocknung der Objektträger bei RT wurden die Zellen mit *Mounting-Medium* eingebettet und mit Deckgläschen bedeckt.

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axioplan 2 unter Verwendung eines 10x Plan-Apochromat Objektives. Die Quantifizierung der Mikrokerne erfolgte über das automatische MetaSystems-Auswertesystem mittels Metafer 4 Metacyte Software, wobei maximal 2000 binukleäre Zellen pro Objektträger berücksichtigt wurden.

### 2.2.10 Isolation der RNA

Die Zellen, die sich in Passage 8-18 befanden, wurden entsprechend den Expositionsbedingungen der verschiedenen Strahlenqualitäten behandelt und mit verschiedenen Dosen exponiert. 6 h bzw. 24 h nach Exposition wurde die RNA der Zellen nach Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy Mini Kit* isoliert. Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurden mit Hilfe eines NanoDrop<sup>®</sup>-Spektrophotometers bestimmt. Hierbei wurden die Kontaminationen mit organischen Lösungsmitteln bzw. Proteinen durch die Quotienten der Absorption bei 260/230 nm bzw. 260/280 nm gemessen. Beide Quotienten sollten einen Wert zwischen 1,8 und 2,2 aufweisen. Die Integrität der RNA wurde mittels des Agilent 2100 *Bioanalyzer* überprüft. Bei dieser *Lab-on-a-chip*-Technologie handelt es sich um ein Mikrofluidik-System, bei der farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert wird. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die als intakt bestimmten RNA-Isolate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.11 Microarrays

#### 2.2.11.1 Durchführung der Microarrays

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels *whole human genome* Microarrays, die die Expression aller Gene einer Probe zum gleichen Zeitpunkt messen, durchgeführt.

Auf den 4 x 44K Microarrays befinden sich 60 bp lange Oligonukleotide, die jeweils spezifisch ein humanes Gen kodieren. Zunächst wird aus der RNA der zu untersuchenden

Probe eine fluoreszenzmarkierte cRNA synthetisiert, die an die komplementäre Sequenz eines Oligonukleotids auf dem Microarray bindet. Je höher die gemessene Fluoreszenzintensität desto mehr mRNA des jeweiligen Gens war in der ursprünglichen Ausgangsprobe enthalten. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol* (Agilent Technologies).

### Transkriptionsmix pro Ansatz (*Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color*)

20	µl	4 x Transkriptionspuffer
15,3	µl	nukleasefreies dH <sub>2</sub> O
8	µl	NTP Mix
6,4	µl	50% PEG
6	µl	0,1 M DTT
2,4	µl	Cyanine 3-CTP
0,8	µl	T7 RNA Polymerase
0,6	µl	Anorganische Pyrophosphatase
0,5	µl	RNaseOut

### cDNA-Mix pro Ansatz (*Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One Color*)

4	µl	5 x First Strand Buffer
2	µl	0,1 M DTT
1	µl	10 mM dNTP Mix
1	µl	MMLV-RT
0,5	µl	RNaseOut

### Hybridisierungsprobe (*Gene Expression Hybridization Kit*)

55	µl	cRNA aus Fragmentierungsmix
55	µl	2 x GEx Hybridisierungspuffer HI-RPM

### Fragmentierungsmix für 4 x 44K Microarrays (*Gene Expression Hybridization Kit*)

1,65	µg	Cyanine 3 markierte cRNA
2,2	µl	25 x Fragmentierungspuffer
11	µl	10 x <i>Blocking agent</i>
ad 52,8	µl	nukleasefreies dH <sub>2</sub> O



Die Versuche wurden mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Pro Probe wurden 400 ng Gesamt-RNA mit 4 µl des *One-Color-Spike Mix* (1:5000 in Verdünnungspuffer) und 1,2 µl T7 Promoter-Primern gemischt und mit nukleasefreiem dH<sub>2</sub>O auf 11,5 µl aufgefüllt. Die RNA-Primer-Lösung wurde im Thermocycler für 10 min bei 65 °C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und danach mit 8,5 µl cDNA-Mix versetzt. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler für 2 h bei 40 °C, 15 min bei 65 °C und anschließend für 5 min bei 4 °C. Im Anschluss wurden 60 µl des Transkriptionsmastermixes zu jeder Probe dazu pipettiert. Im Thermocycler erfolgte nachfolgend für 2 h bei 40 °C die cRNA-Synthese und Amplifikation der Cyanin 3-CTP-gekoppelten RNA, die danach über eine Säule mittels des RNeasy® Mini Kits aufgereinigt wurde. Die Konzentration und die Markierungseffizienz der Cyanin 3 markierten cRNA wurde mit Hilfe des NanoDrop®-Photometers bestimmt. Die Proben, deren cRNA-Gehalt größer als 1,65 µg und deren spezifische Aktivität größer als 9,0 pmol Cyanin 3 pro µg cRNA waren, wurden für die anschließende Hybridisierung verwendet. Hierbei wurden 1,65 µg RNA mit dem Fragmentierungsmix auf ein Volumen von 55 µl aufgefüllt und für 30 min bei 60 °C im Thermocycler inkubiert. Danach wurden die Proben mit 55 µl des GEx Hybridisierungspuffer luftblasenfrei gemischt, 1 min bei RT und 16100 x g zentrifugiert und bis zum Auftrag auf den Microarray auf Eis verwahrt. Anschließend wurde ein Objektträger in die Hybridisierungskammer eingespannt und je Probe 100 µl auf ein von insgesamt vier Feldern des Objektträgers aufgetragen. Nach Beladung aller vier Felder mit je einer Probe wurde auf diesen der Objektträger, auf dem sich vier Microarrays befanden, gelegt. Nach vollständigem Zusammenbau der Hybridisierungskammern inklusive Microarrays wurden diese im Hybridisierungsofen fixiert und für 17 h bei 65 °C inkubiert. Danach wurde die Hybridisierungskammer aufgeschraubt und die beiden Objektträger in einem Glasgefäß, das mit Waschpuffer 1 gefüllt war, voneinander getrennt. Der Objektträger mit den Microarrays wurde dann erneut für 1 min mit Waschpuffer 1 und anschließend für 1 min mit 37 °C warmen Waschpuffer 2 gewaschen. Im Anschluss wurden die Microarrays in das Scannerkarussell eingespannt und mittels der *Agilent Scan Control Software* gescannt.

### 2.2.11.2 Microarray-Analyse

Die Daten wurden anschließend mit der *Feature Extraction Software* weiter verarbeitet, unter anderem erfolgte eine erste Qualitätskontrolle der Microarrays. Mit Hilfe der *Agilent GeneSpring GX Software* wurden die Daten ausgewertet. Dabei erfolgte eine weitere Qualitätskontrolle der Microarrays und eine Filterung der Daten aufgrund ihrer Signalstärke. Dabei wurden Ausreißer und Signale entfernt, welche in 25% der Proben keine Intensität

hatten, die höher als die Hintergrundintensität war. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) bzw. der gepaarte t-Test, die es ermöglichen die Daten von drei oder mehr unabhängigen Gruppen bzw. zwei Gruppen zu vergleichen, wurden angewendet um signifikant veränderte Genexpressionen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu identifizieren. Im Anschluss wurden die p-Werte mittels FDR (*False discovery rate*) nach der Methode von Benjamini-Hochberg Fallzahl-korrigiert. Das Filtern der Daten für die signifikant veränderte Genexpressionen und Induktion biologischer Prozesse und Signalwege bzw. für die Identifizierung von Kandidatengenen, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben, wird unter 3.6.2 bzw. 3.7 beschrieben.

Für die funktionale Analyse der biologischen Prozesse und Signalwege wurden die signifikant veränderten Gene nach Exposition je nach Strahlenqualität, Zeitpunkt bzw. Dosis in Genlisten zusammengefasst und mittels der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery 6.7* (DAVID) [88] analysiert. Über diese Software erfolgte die Zuordnung der signifikant veränderten Gene zu den verschiedenen biologischen Prozessen bzw. Signalwegen. Dabei bezog sich die Zuordnung bezüglich der Signalwege auf die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) [100].

### 2.2.12 Quantitative real-time PCR

Bei der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) wird zunächst RNA in cDNA transkribiert, welche dann als Template in eine PCR eingesetzt wird. Das Besondere der qRT-PCR ist, dass während der Amplifikation der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green an die doppelsträngige DNA bindet, welches nach jedem Zyklus detektiert wird, wodurch eine Echtzeit-Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge möglich ist. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Amplifikat-Menge zu, wobei nur während der exponentiellen Phase der qRT-PCR eine korrekte Quantifizierung erfolgt, da nur während dieser Zeit optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen.

#### 2.2.12.1 DNase-Behandlung

Da bei der Isolation der RNA mit dem *RNeasy Mini Kit* auch geringe Mengen DNA isoliert werden, wurden die RNA-Isolate mit dem *Turbo DNA-free Kit* behandelt. Die DNA-Kontamination kann bei der qRT-PCR zu falschen Ergebnissen führen, wenn anstatt der RNA die DNA als Template für die qRT-PCR dient. Dies lässt sich selbst durch Intron-überspannende Primer nicht verhindern, da im Genom sogenannte Pseudogene vorhanden sind, die ähnliche Sequenzen wie normale Gene haben, aber nicht funktionell sind. Pseudogene entstehen durch Duplikationsmodifikationen oder Retrotransposition, bei der

mRNA revers transkribiert und in das Genom integriert wird. Torrents *et al.* [225] identifizierte ca. 20.000 Pseudogene und Zhang *et al.* [255] wies 52 Pseudogene für *GAPDH* nach. Die Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls des *Turbo DNA-free Kits*. Zu der in 50 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O gelösten RNA wurde 5 µl 10x TURBO DNase Puffer und 1 µl TURBO DNase hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde 2 µl DNase *Inactivation Reagent* appliziert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1,5 min bei 16.000 x g und RT wurde der Überstand inklusive RNA sorgfältig abgenommen. Die RNA-Konzentration, -Reinheit und -Integrität wurde bestimmt bzw. überprüft (siehe 2.2.10). Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.12.2 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Zunächst wurden die für die zu untersuchenden Gene spezifischen Intron-überspannenden Primer mit Hilfe der online-Software *NCBI/ Primer-BLAST* konstruiert. Die Primer wurden so gestaltet, dass das Produkt eine Länge zwischen 100 bp und 150 bp aufwies, die *Annealing*-Temperatur bei 59 °C und die Schmelztemperatur des Produktes zwischen 65 und 85 °C, idealerweise bei 75 °C, lag. Für die qRT-PCR wurden die gleichen RNA-Proben wie für die Microarrays eingesetzt.

Tab. 3: qRT-PCR Bedingungen

Schritte	Temperatur / °C	Zeit / min
1. cDNA-Synthese	50	30
2. Vollständige Denaturierung	95	15
3. Denaturierung	94	0,25
4. Hybridisierung	59	0,5
5. Elongation	72	0,67

} 40x

Es wurde das *Power SYBR® Green RNA-to-CT<sup>TM</sup> 1-Step Kit* verwendet. Zunächst wurde der qRT-PCR Mix mit den Primern auf Eis angesetzt und in die 96-well Platte pipettiert. Nach Zugabe von 30 ng RNA zu der jeweiligen Probe wurde die 96-well Platte für 1 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die qRT-PCR mit den in Tab. 3 beschriebenen Bedingungen. Zusätzlich wurde für jeden Primer die Effizienz der DNase-Behandlung der RNA-Isolate überprüft, indem qRT-PCR's ohne reverse Transkriptase angesetzt wurden. Als Referenz wurde die Expression von *GAPDH* für jede Probe gemessen, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen. Die Spezifität des Produktes wurde im Anschluss an die

qRT-PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Das detektierte Signal wurde mit dem Referenzfarbstoff ROX korrigiert. Mittels *Sequence Detection Software* erfolgte die Auswertung, bei der die relative Expression der gemessenen Proben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle wie folgt berechnet wurde:

1. Normalisierung zur endogenen Kontrolle (*GAPDH*):

$$\text{Ct Zielgen} - \text{Ct endogene Kontrolle (GAPDH)} = \Delta\text{Ct Probe/ Kalibrator}$$

2. Normalisierung zum Kalibrator (unbestrahlte Kontrolle):

$$\Delta\text{Ct Probe (exponierte Proben)} - \Delta\text{Ct Kalibrator (Kontrolle)} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

3. Einsetzen in folgende Formel:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Mit Hilfe von *Microsoft Excel* wurden Mittelwerte, Standardabweichungen der Replikate und signifikante Expressionsänderungen mittels *Student's t-Test* berechnet.

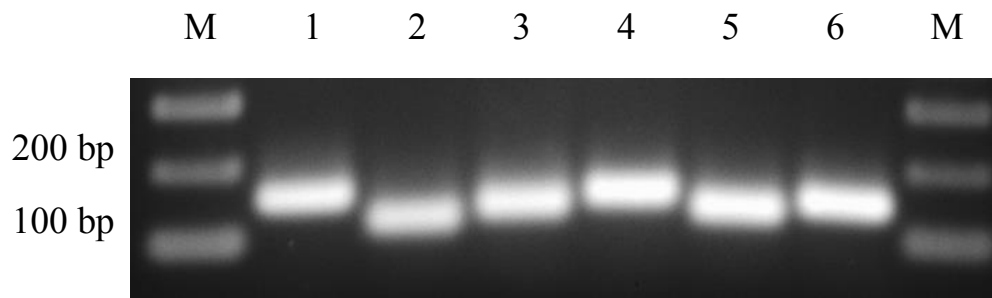
### Reaktionskomponenten eines Ansatzes einer qRT-PCR

200	nM	Primer down
200	nM	Primer up
0,16	µl	RT Enzym Mix (125 x)
10	µl	RT PCR Mix (2 x)
30	ng	RNA-Template
ad 20	µl	nukleasefreies dH <sub>2</sub> O

### **2.2.12.3 Überprüfung der Primerspezifität**

#### **2.2.12.3.1 Aufreinigung und Agarosegelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte**

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden die qRT-PCR-Produkte nach Herstellerangaben unter Verwendung des *QIAquick® PCR Purification Kits* aufgereinigt. Anschließend wurden 20 µl der aufgereinigten Proben auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen und einer Agarosegelelektrophorese [199] unterzogen. Dabei handelt es sich um ein Trennverfahren basierend auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle in einer Gelmatrix im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren, die durch ihre negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode wandern, ist indirekt proportional zum Molekulargewicht.



**Abb. 7: Exemplarisches Agarosegel zur Überprüfung der Spezifität der Primer.**

Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurden die qRT-PCR-Produkte aufgereinigt und 20 µl davon wurden aufgetragen. Das demonstrative Agarosegel zeigt die qRT-PCR-Produkte der Kandidatengene und *GAPDH*. M: Marker; 1: *GAPDH* 149 bp; 2: *DNAJC1* 110 bp; 3: *PRTFDC1* 123 bp; 4: *TNFAIP8L1* 142 bp; 5: *PPP1R14C* 122 bp; 6: *KLF10* 138 bp.

Für die Gelmatrix wurde eine Agarosekonzentration von 1,5% (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 5 x DNA-Probenpuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von ca. 11 V pro cm Elektrodenabstand in horizontalen Gelkammern durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Danach wurde die DNA im Gel für 20 min mit 0,5% Ethidiumbromidstandardlösung inkubiert und angefärbt. Nachdem das Gel für 20 min mit dH<sub>2</sub>O entfärbt wurde, erfolgte die Dokumentation der DNA in einer Geldokumentationsanlage mittels UV-Bestrahlung.

Die Größe der im Gel getesteten Amplifikate stimmte mit der zuvor kalkulierten Größe für alle Produkte überein, was auf eine spezifische Bindung der Primer hindeutete (siehe Abb. 7). Da die qRT-PCR-Produkte anschließend sequenziert wurden, wurde hier nur ein exemplarisches Agarosegel mit den Kandidatengenen gezeigt.

#### DNA-Probenpuffer (5 x)

100	mM	EDTA
33	%	Glycerol
0,05	%	BPB (w/v)

#### TBE-Puffer (pH 8,3)

89	mM	Tris-Base
89	mM	Borsäure
2,5	mM	EDTA

#### Ethidiumbromid-Färbelösung

0,5	%	EtBr (w/v)
-----	---	------------

#### **2.2.12.3.2 Sequenzierung der qRT-PCR-Produkte**

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden die aufgereinigten qRT-PCR-Produkte zusammen mit den dazugehörigen Primern kommerziell durch die Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) sequenziert. Alle Sequenzen konnten durch die Firma sicher editiert werden. Die Gesamtsequenzen der aufgereinigten qRT-PCR-Produkte wurden mit der

online-Software *NCBI/ BLAST* gescannt und stimmen zu 100% mit den dazugehörigen dokumentierten Gensequenzen überein, was für eine hohe Spezifität der Primer steht.

### **2.2.13 Präparation der Metaphase-Platten für die Bestimmung des Ploidiegrades**

Bei verschiedenen Zellpassagen sollte der Ploidiegrad der Zellen bestimmt werden. Da im Interphase-Zellkern die Chromosomen nicht zu erkennen sind, beschränkt sich die Untersuchung der Anzahl der Chromosomen auf die Metaphase-Chromosomen von sich teilenden Zellen. Das Spindelgift Colzemid bewirkt dabei die Auflösung der Mitosespindel, so dass die Verteilung der Metaphase-Chromosomen auf die beiden Tochterkerne verhindert wird. Dadurch können Zellen in der Metaphase angereichert werden [240].

Die Zellen wurden für 3-4 h mit 0,1µg/ml Colzemid kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und mit hypotonischer KCl-Lösung (75 mM) vorsichtig resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Behandlung mit der hypotonischen KCl-Lösung quellen die Zellen auf. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und vorsichtig mit eiskaltem Methanol/ Eisessig (3:1, v/v) resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und erneut mit eiskaltem Methanol/ Eisessig (3:1, v/v) resuspendiert. Im Anschluss wurden ca. 8 µl der fixierten Zellen auf einem mit Methanol gereinigten Objektträger aus 8 cm Höhe aufgetropft. Danach wurde der Objektträger bei 37 °C für 1-2 min getrocknet, mit dem *Mounting*-Medium ProLong Goldantifade mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 2500) mit einem Leica 63x/1,4 Plan-Apochromat Ölobjectiv analysiert.

### **2.3 Statistik**

Die angegebenen Standardabweichungen, die ein Maß dafür sind, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert streuen, resultierten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe des *Student's* t-Test. Dabei wurden Werte von  $p < 0,05$  als signifikant erachtet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Dosimetrische Betrachtung in Bezug auf die $^{123}\text{IdU}$ -Exposition

Für ein verbessertes Verständnis der biologischen Wirksamkeit von  $^{123}\text{IdU}$  war eine dosimetrische Betrachtung nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition im zellulären und subzellulären Maßstab notwendig. Aufgrund der kurzen Reichweite von niederenergetischen Auger Elektronen war die Energiedeposition extrem inhomogen, so dass für eine aussagekräftige Dosimetrie Daten über Zell- und Zellkernvolumen erhoben wurden. Zudem wurden die zelluläre Aufnahme von  $^{123}\text{IdU}$  und die Inkorporation in die DNA bestimmt.

#### DNA-Aufnahme von $^{123}\text{IdU}$ :

Resultierend aus der kurzen Reichweite von niederenergetischen Auger Elektronen war die biologische Wirkung abhängig von der intrazellulären Verteilung des Nuklids [85, 179]. DNA-inkorporierte Auger Elektronen Emitter (AEE) haben die höchste biologische Wirksamkeit, daher war es für die Dosimetrie wichtig den Anteil an DNA-inkorporierten  $^{123}\text{IdU}$  mittels DNA-Isolation zu bestimmen.

#### Bestimmung des Zell- bzw. Zellkernvolumens:

Die Bestimmung des Zell- bzw. Zellkernvolumens war wichtig für die Kalkulation der absorbierten Energiedosis nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, da die Energiedosis als absorbierte Energiemenge pro Masseinheit definiert ist. Da die Reichweite von niederenergetischen Auger Elektronen sehr kurz ist, stellten hierbei der Zellkern bzw. die Zelle die relevante Masseinheit dar, je nachdem wo sich der größte Anteil an  $^{123}\text{IdU}$  befand.

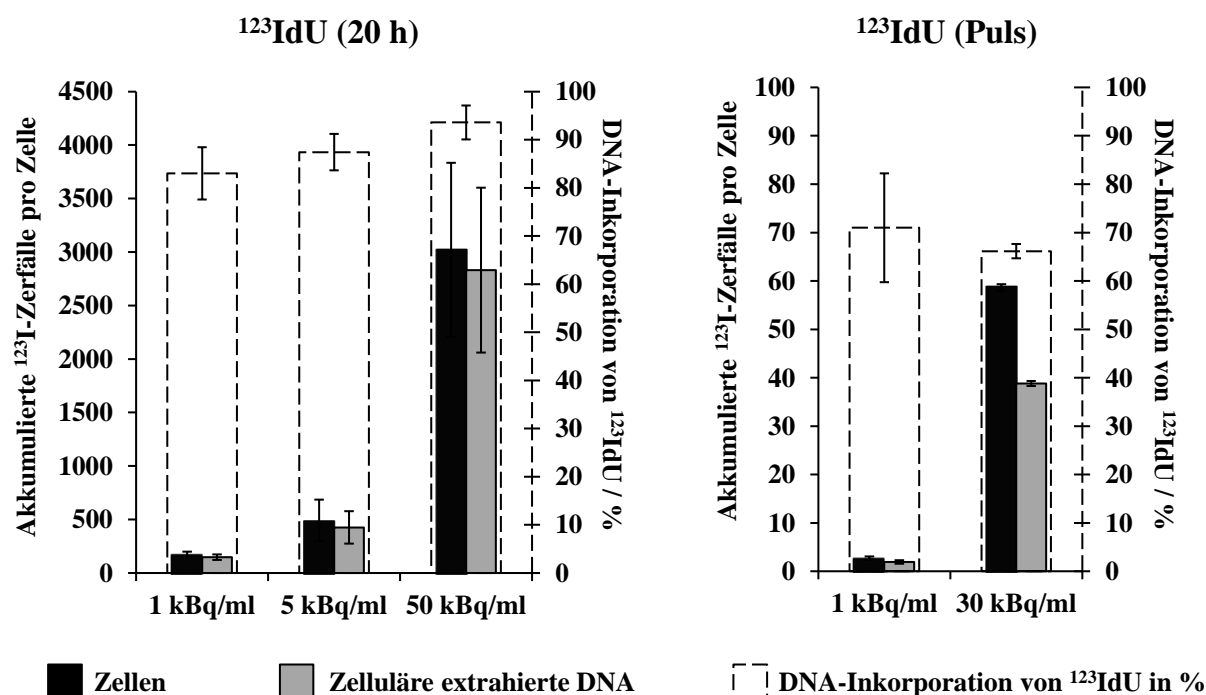
#### Zelluläre Aufnahme-Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$ :

Aufgrund der sehr kurzen Reichweite von niederenergetischen Auger Elektronen war die biologische Wirkung auf eine Zelle vor allem davon abhängig, ob diese den AEE aufgenommen hat oder nicht. Daher war es wichtig den Anteil von  $^{123}\text{IdU}$ -gelabelten Zellen zu bestimmen.

#### 3.1.1 DNA-Aufnahme von $^{123}\text{IdU}$

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, synchronisiert. Für die 20-stündige  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition wurden die Zellen mit 1, 5 und 50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  und für das  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling mit 1 und 30 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  kultiviert. Anschließend erfolgten die DNA-Extraktion bzw. die Aktivitätsbestimmung der vor der DNA-Extraktion eingesetzten Zellen sowie die der extrahierten DNA.

Die DNA-Extraktionsanalyse zeigte, dass im Mittel 88% bzw. 69% der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität, die in Jurkat-Zellen nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling gemessen wurde, in der DNA lokalisiert war (Abb. 8). Die akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle der eingesetzten Zellen sowie die der zellulären extrahierten DNA waren annähernd proportional zu der eingesetzten  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivitätskonzentration.



**Abb. 8: DNA-Aufnahme von  $^{123}\text{IdU}$  in Jurkat-Zellen.**

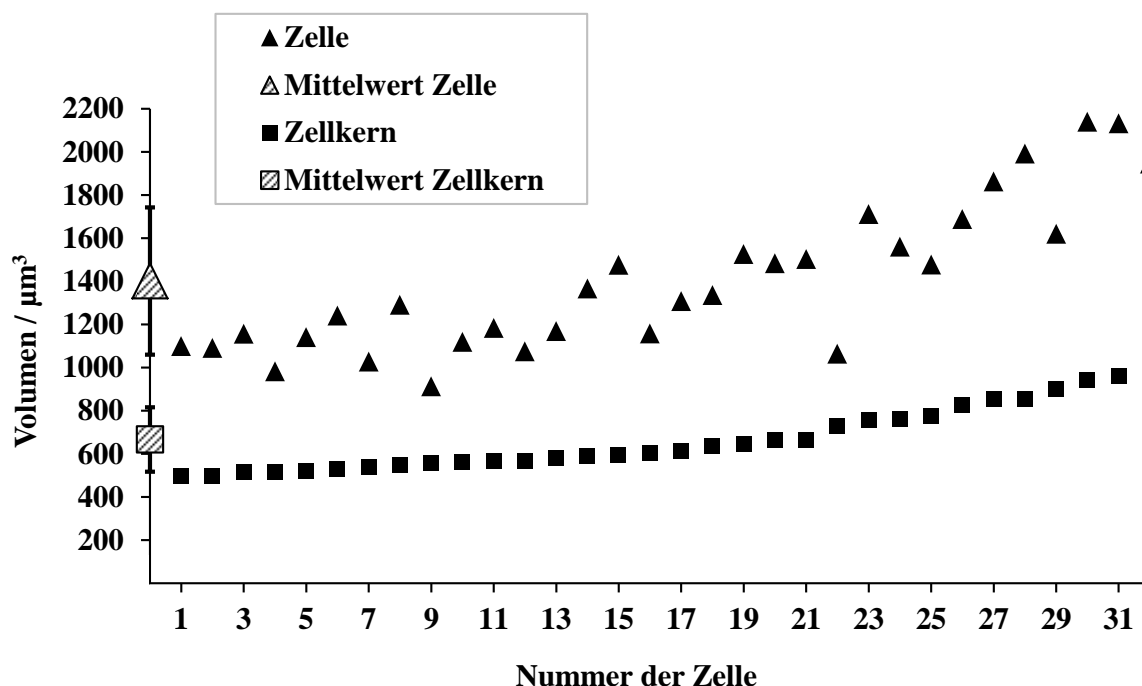
Der Großteil der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität, die in Jurkat-Zellen nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling gemessen wurde, war in der DNA lokalisiert. (Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen).

Da die Versuche zeigten, dass der Großteil der im Zellpellet gemessenen  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität in der DNA lokalisiert war, wurde der Zellkern als relevantes Target für die Berechnung der Dosis von  $^{123}\text{IdU}$  ausgewählt (siehe 2.2.6.7).

### 3.1.2 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns

Insgesamt wurde das Zellkern- sowie Zell-Volumen von 32 nicht-synchronisierten Zellen mittels konfokaler Mikroskopie vermessen (Abb. 9). Die 3-D Vermessungen ergaben, dass das mittlere Volumen des Zellkerns bzw. der Zelle ca.  $667 \pm 149 \mu\text{m}^3$  bzw.  $1400 \pm 342 \mu\text{m}^3$  betrug, was einem Durchmesser von  $10,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$  bzw.  $13,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$  entsprach.





**Abb. 9: Volumenbestimmung von Jurkat-Zelle und deren Zellkern.**

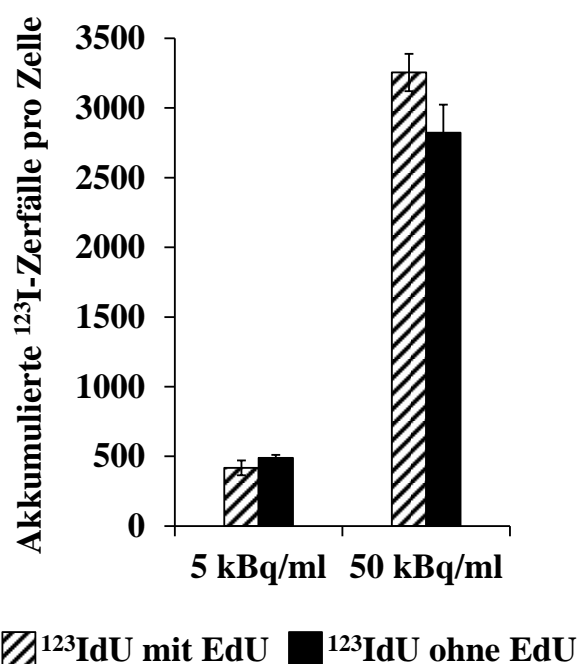
Die Größe der Zellvolumina korrelierte annähernd mit der der Zellkernvolumina.

Das Volumen des größten Zellkerns war doppelt so groß wie das des kleinsten Zellkerns, welches wahrscheinlich darin begründet war, dass der DNA-Gehalt von G2/M-Zellen doppelt so groß war wie der von G1-Zellen. Weiterhin war festzustellen, dass die Zellvolumina mit den zugehörigen Zellkernvolumina korrelierten.

### 3.1.3 Zelluläre Aufnahme-Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$

Die Zellen wurden identisch behandelt wie bei den anderen 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Expositionsversuchen (siehe 2.2.6.2), nur dass die Zellen nicht ausschließlich mit  $^{123}\text{IdU}$  sondern simultan auch mit dem Proliferationsmarker EdU co-inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse, bei der über die zelluläre Verteilung von EdU auch Rückschlüsse auf die Verteilung von  $^{123}\text{IdU}$  gezogen werden konnte, da beide Nukleosidanaloge gemeinsam inkorporiert wurden.

Um zunächst zu überprüfen, ob EdU einen Einfluss auf die  $^{123}\text{IdU}$ -Aufnahme hatte, wurden 20-stündige Versuche mit synchronisierten Zellen exemplarisch mit 5 bzw. 50 kBq/ml  $^{123}\text{IdU}$  mit als auch ohne EdU durchgeführt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die akkumulierten Zerfälle pro Zelle nach Inkorporation mit  $^{123}\text{IdU}$  gegenüber denen nach Inkorporation mit  $^{123}\text{IdU}/\text{EdU}$  sehr ähnlich waren (Abb. 10). Somit war es möglich mittels Co-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}/\text{EdU}$  den Anteil an Zellen zu bestimmen, die  $^{123}\text{IdU}$  inkorporierten.



**Abb. 10: Zelluläre Aufnahme von  $^{123}\text{I}$ IdU sowohl mit als auch ohne EdU.**

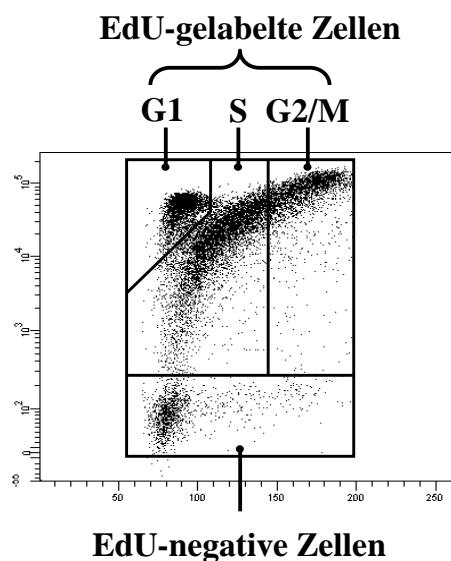
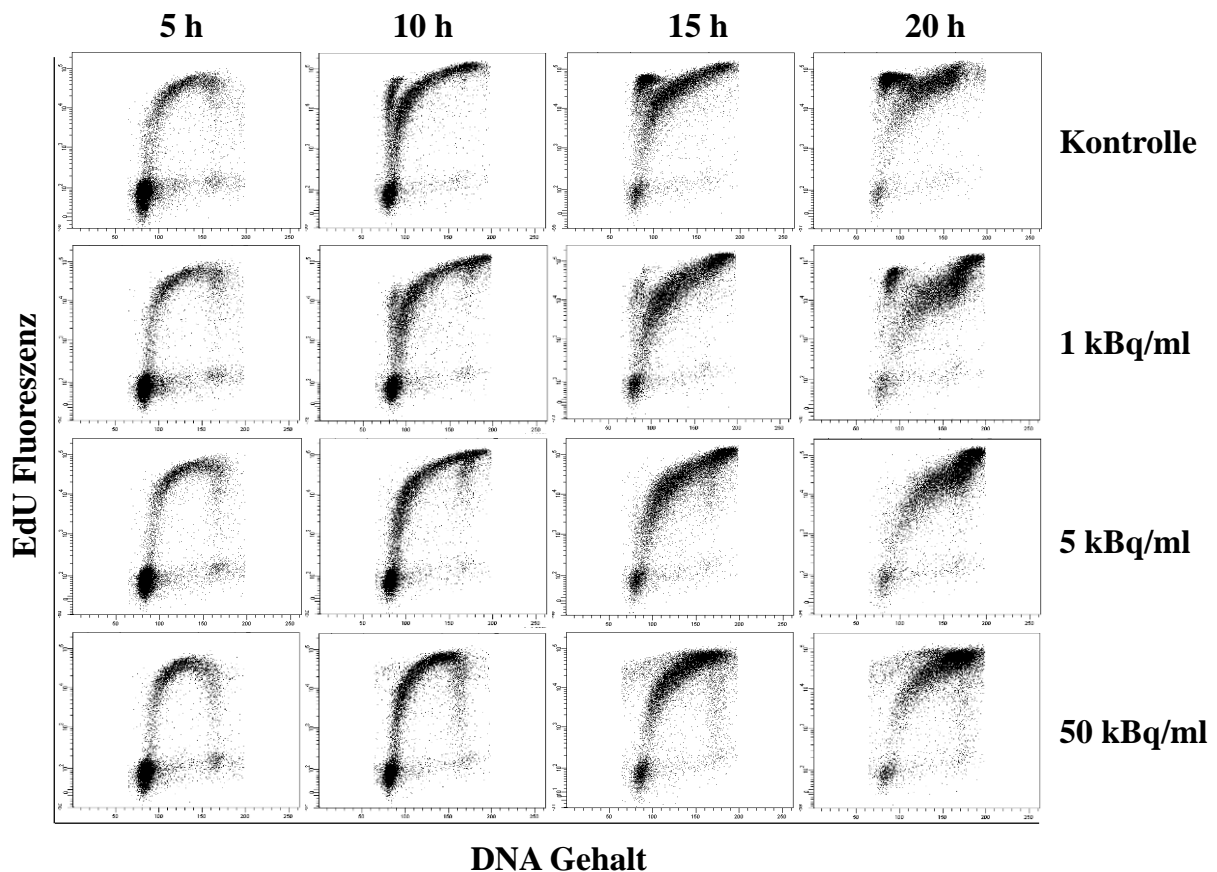
Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.

Die geringen Unterschiede zwischen den Versuchen mit bzw. ohne EdU lassen sich vermutlich auf geringfügige Abweichungen im Zellwachstum zurückführen.

Für die Versuche in Abb. 11 wurden die Zellen, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, synchronisiert, mit 1, 5 bzw. 50 kBq/ml  $^{123}\text{I}$ IdU und simultan mit EdU für 20 h kultiviert. Alle 5 h wurde ein Teil der Zellen für die Analyse entnommen. Am Ende der 20-stündigen Inkubation wurden die Aktivitäten in den Zellen bestimmt und die akkumulierten Zerfälle pro Zelle kalkuliert (111, 417 bzw. 3255 akkumulierten Zerfälle pro Zelle für 1, 5 bzw. 50 kBq/ml  $^{123}\text{I}$ IdU/EdU).

Anhand der *Dotplots* in Abb. 11 war sehr gut die zeitabhängige Zunahme von EdU-positiven Zellen und zeitgleich die Abnahme von EdU-negativen Zellen zu erkennen, welches in Abb. 12 quantifiziert und dargestellt wird. Am Ende der 20-stündigen Exposition war festzustellen, dass durchschnittlich 94% der Zellen EdU und somit auch  $^{123}\text{I}$ IdU inkorporiert hatten (Abb. 12).

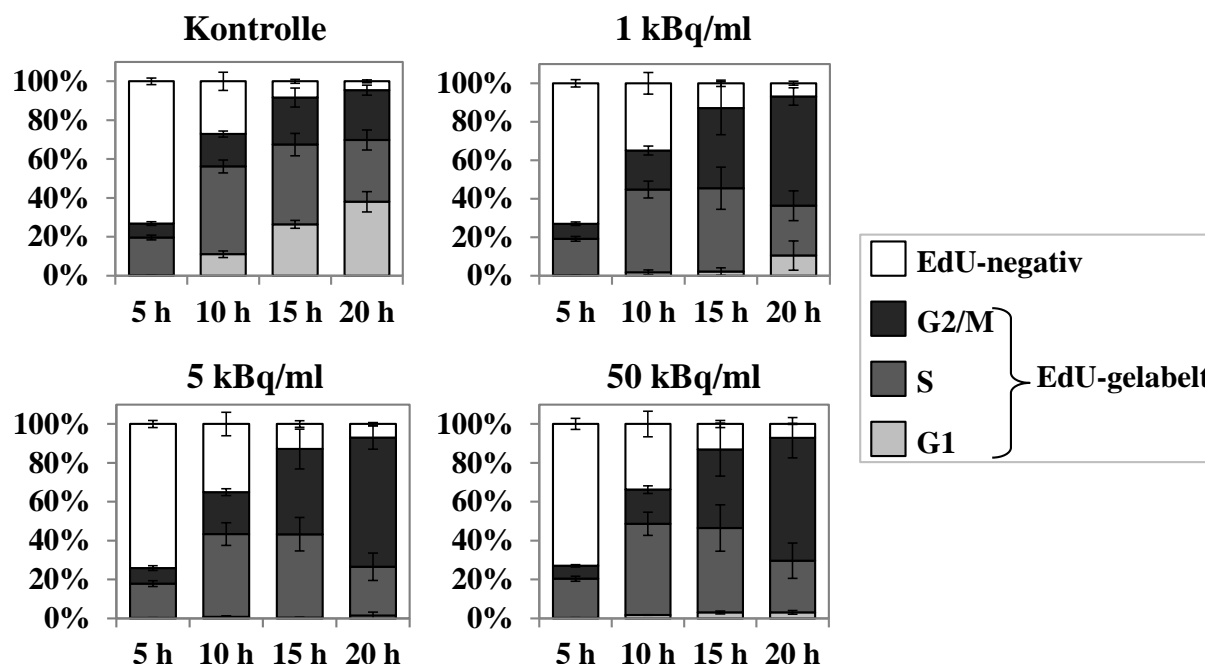
Die Quantifizierung der Zellzyklusverteilung von EdU-gelabelten Zellen dokumentierte, dass der Anteil an EdU-gelabelten G2/M-Zellen 20 h nach Exposition mit  $^{123}\text{I}$ IdU/EdU von 26% in der Kontrolle auf 57%, 66% bzw. 63% nach 111 (1 kBq/ml), 417 (5 kBq/ml) bzw. 3255 (50 kBq/ml) akkumulierten Zerfälle pro Zelle anstieg.



**Abb. 11: Repräsentative DNA-kombinierte EdU *Dotplots* von Jurkat-Zellen nach Co-Labeling mit  $^{123}\text{I}$ IdU/EdU.**

Nach Synchronisation wurden die Zellen mit 1, 5 bzw. 50 kBq/ml  $^{123}\text{I}$ IdU und simultan mit EdU für 20 h kultiviert. *Dotplots* der Kontrollzellen wurde genutzt, um *Gates* für die zellzyklusabhängige Quantifizierung der Anteile der EdU-gelabelten Zellen zu setzen.

Simultan sank der Anteil an post-mitotischen EdU-gelabelten G1-Zellen von 38% in der Kontrolle auf 10%, 1% bzw. 3% nach 111, 417 bzw. 3255 akkumulierten Zerfälle pro Zelle (Abb. 12). Somit waren 417 akkumulierte  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle ausreichend, um einen massiven G2/M-Zellzyklusarrest in Jurkat-Zellen zu induzieren.



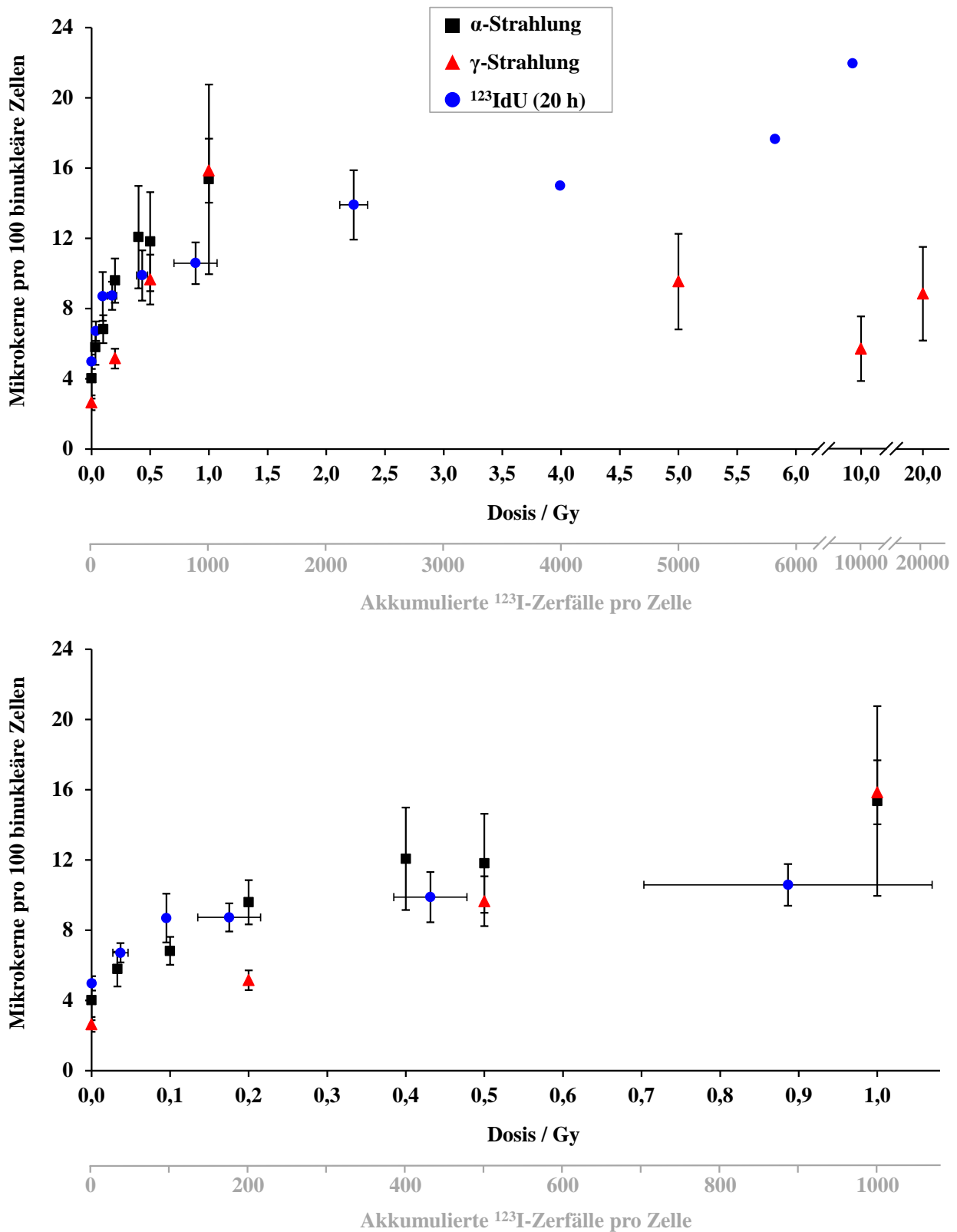
**Abb. 12: Quantifizierung der Zellzyklusverteilung von EdU-gelabelten Jurkat-Zellen nach Co-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}/\text{EdU}$ .**

Der Anteil an EdU-gelabelten G2/M-Zellen war 20 h nach Exposition mit  $^{123}\text{IdU}/\text{EdU}$  in den  $^{123}\text{IdU}$ -exponierten Zellen deutlich höher als in der Kontrolle. Zeitgleich war der Anteil an post-mitotischen EdU-gelabelten G1-Zellen in den  $^{123}\text{IdU}$ -exponierten Zellen deutlich niedriger als in der Kontrolle. Demzufolge induzierte  $^{123}\text{IdU}$  einen G2/M-Zellzyklusarrest in Jurkat-Zellen. (Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.)

### 3.2 Bestimmung der Mikrokerninduktion 24 h nach Exposition

Der Mikrokern-Assay wurde angewendet, um zu bestimmen, in welchem Ausmaß die durch ionisierende Strahlung bedingte DSB-Induktion zu chromosomalen Schäden führte.

Abb. 13 zeigt, dass für alle drei Strahlenqualitäten 24 h nach Exposition die Anzahl an Mikrokernen dosisabhängig anstieg, für die  $\gamma$ -Bestrahlung allerdings nur bis 1 Gy. Die Anzahl an Mikrokernen nach  $\gamma$ -Bestrahlung nach 5, 10 und 20 Gy war niedriger als die nach 1 Gy. Die Mikrokerninduktion 24 h nach der 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition nahm bis zu einer Dosis von ca. 0,4 Gy stark zu und lief danach bei höher werdender Dosis in eine Sättigung. Für alle drei Strahlenqualitäten war die Mikrokerninduktion 24 h nach Exposition bei gleichen Strahlendosen bis zu einer Dosis von 1 Gy ähnlich (Abb. 13), so dass die Mikrokernbildung in Jurkat-Zellen als unabhängig von der Strahlenqualität betrachtet werden konnte.



**Abb. 13: Mikrokerninduktion in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und 20-stündiger  $^{123}\text{I}$ -U-Exposition.**

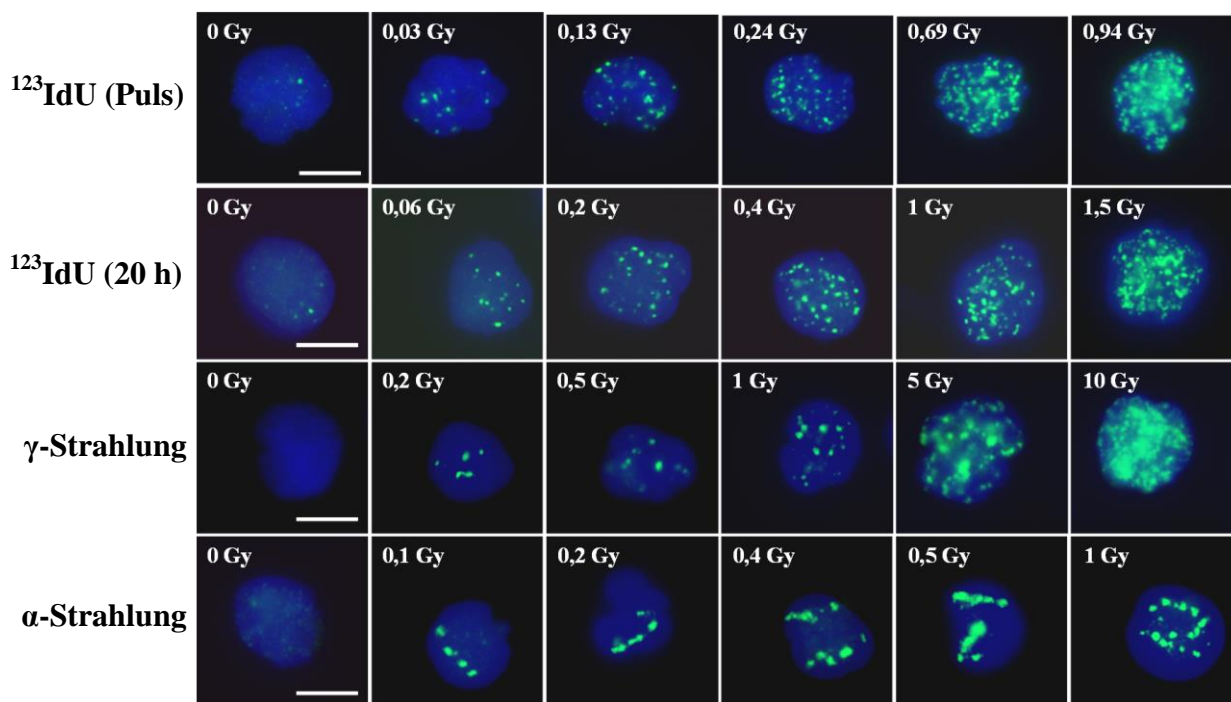
Die Analyse der Mikrokerninduktion wurde mittels automatischer Bildanalyse durchgeführt, bei der mindestens 8000 binukleäre Zellen pro Datenpunkt ausgewertet wurden. (Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.)

### 3.3 $\gamma$ -H2AX Analyse

Die Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci durch ionisierende Strahlung dient als Biomarker für DSB in der DNA. Da während der 20-stündigen Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  eine vermehrte DNA-Reparatur nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden zusätzlich Experimente mit einem kurzzeitigen  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling mit anschließender Dosisakkumulation im kryokonservierten Zustand durchgeführt. Dadurch wurde eine verbesserte Vergleichbarkeit mit der  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition erreicht, da es sich hierbei ebenfalls um Kurzzeitexpositionen handelte.

#### 3.3.1 Mikroskopische Charakterisierung und Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX Foci 45 min nach Exposition

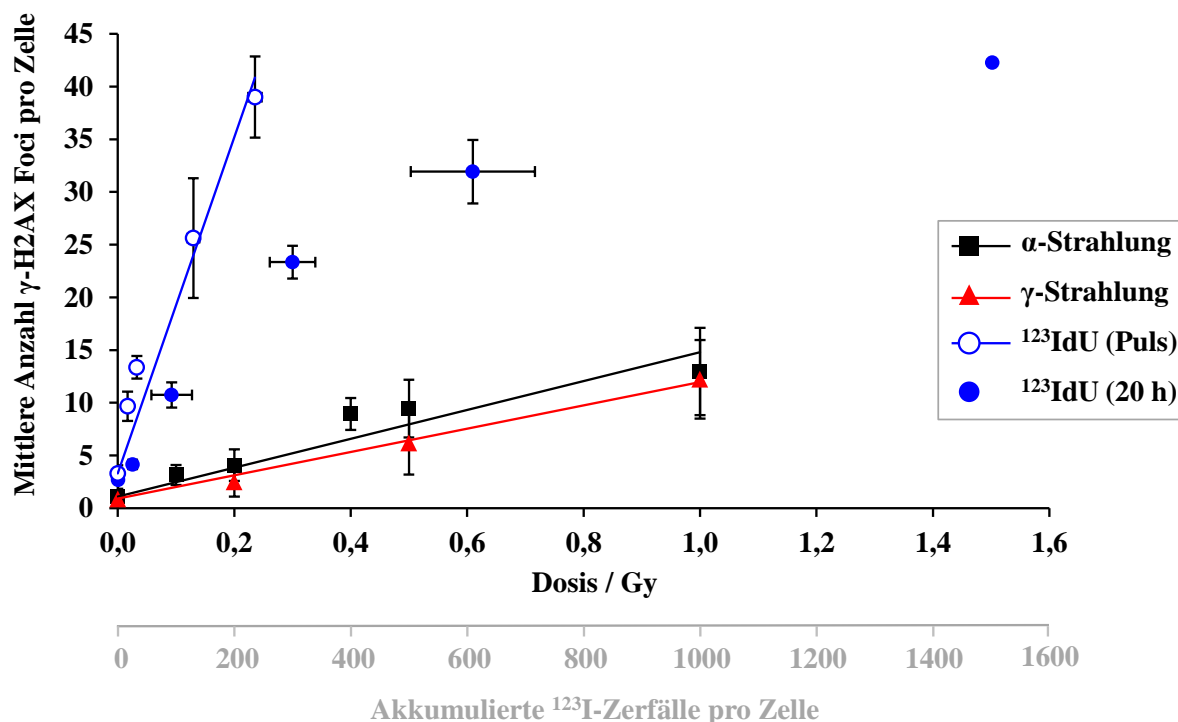
Die mikroskopische Charakterisierung der  $\gamma$ -H2AX Foci 45 min nach Exposition zeigte häufig ein streifenförmiges *Clustering* der Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung als Ergebnis einzelner  $\alpha$ -Partikel-Durchgänge durch den Zellkern (Abb. 14), während die räumliche Verteilung der Foci nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{123}\text{IdU}$  eher homogen war.



**Abb. 14: Ausbildung von  $\gamma$ -H2AX Foci in Jurkat-Zellen 45 min nach  $\gamma$ -Bestrahlung,  $\alpha$ -Bestrahlung, 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling.**

Die durch  $\alpha$ -Partikel induzierten Foci waren durchschnittlich größer und/oder signalstärker im Vergleich zu den Foci induziert nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{123}\text{IdU}$ . ( $\gamma$ -H2AX Antikörper (grün), Zellkern/ Chromatin (blau), Vergrößerungs-Balken = 5  $\mu\text{m}$ )

Durchschnittlich waren die durch  $\alpha$ -Partikel induzierten Foci wesentlich größer und/oder signalstärker als Foci induziert nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{123}\text{IdU}$ . Einzelne durch  $^{123}\text{IdU}$  induzierte Foci ähnelten in Größe und Intensität eher den durch  $\gamma$ -Bestrahlung induzierten Foci. Aufgrund der optischen Auflösungsgrenze konnten einige Foci-Cluster, v. a. nach  $\alpha$ -Bestrahlung, bei denen sich einzelne Foci nicht klar voneinander diskriminieren ließen, als einzelne Foci gezählt.



**Abb. 15: Mikroskopische Quantifizierung der mittleren Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci pro Jurkat-Zelle 45 min nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung und 45 min nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bzw. 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.** Im Gegensatz zur  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung zeigte die mittlere Foci-Anzahl pro Zelle einen sehr deutlichen dosisabhängigen Anstieg nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling sowie nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition (Für  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und das  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling wurden Regressionsgeraden kalkuliert. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.)

Die mikroskopische Quantifizierung 45 min nach Exposition zeigte, dass die mittlere Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle für alle Strahlenqualitäten dosisabhängig anstieg (Abb. 15). Die mittlere Foci-Anzahl nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung war bei gleichen Strahlendosen sehr ähnlich, welches von den nahezu identischen Anstiegen der Regressionsgeraden nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung bestätigt wurde und damit einem RBE-Wert von ca. 1 entsprach. Wenn es bei gleichen Strahlendosen Unterschiede in der mittleren Foci-Anzahl zwischen beiden Strahlenqualitäten gab, waren diese nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).

Um eine geeignete Vergleichbarkeit zwischen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition mit  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung herzustellen, wurde das Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  betrachtet (siehe 3.3). Die mittlere Foci-

Anzahl pro Zelle nach Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  zeigte dosisabhängig einen enormen linearen Anstieg, der ca. 13-mal höher war als im Vergleich zur  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung. Dies entsprach einem RBE-Wert von 13.

Die mittlere Anzahl von Foci pro Zelle nach 20-stündiger Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  stieg nicht-linear an und schien bei höher werdender Dosis in eine Sättigung zu laufen. Die mittlere Foci-Anzahl pro Zelle nach 0,05; 0,1 bzw. 0,2 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling war vergleichbar mit der 3,2-; 2,7- bzw. 4,6-fachen Dosis nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.

Die Daten nach dem Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  waren geeignet, um die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall zu berechnen, da die Zellen während der Dosisakkumulation eingefroren waren und demzufolge DNA-Reparatur nahezu ausgeschlossen werden konnte. Anhand der dazugehörigen Regressionsgerade (Abb. 15) wurde eine Rate von 0,16  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall bestimmt.

#### **3.3.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Signalintensität 45 min nach Exposition**

Die relative mittlere Intensität des  $\gamma$ -H2AX-Signals stieg für alle Strahlenqualitäten 45 min nach Exposition dosisabhängig an und das, mit Ausnahme der 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, nahezu linear (Abb. 16).

Aus den Anstiegen der Regressionsgeraden in Abb. 16 wurde bestimmt, dass die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach  $\alpha$ -Bestrahlung bei gleicher Dosis ca. 10-fach erhöht war im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung. Dies entsprach einem RBE-Wert von 10.

Bei gleichen Dosen war der Anstieg der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling im Vergleich zur  $\alpha$ -Bestrahlung nahezu identisch und ca. 8-fach höher im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung.

Die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach 20-stündiger Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  stieg dosisabhängig an und zeigte einen nicht-linearen Kurvenverlauf. Hierbei schien die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität, mit Ausnahme von 2,8 Gy, bei höher werdender Dosis in eine Sättigung zu laufen. Die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach 0,1; 0,5 bzw. 1 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling war vergleichbar mit der 1-; 1,4- bzw. 2-fachen Dosis nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.



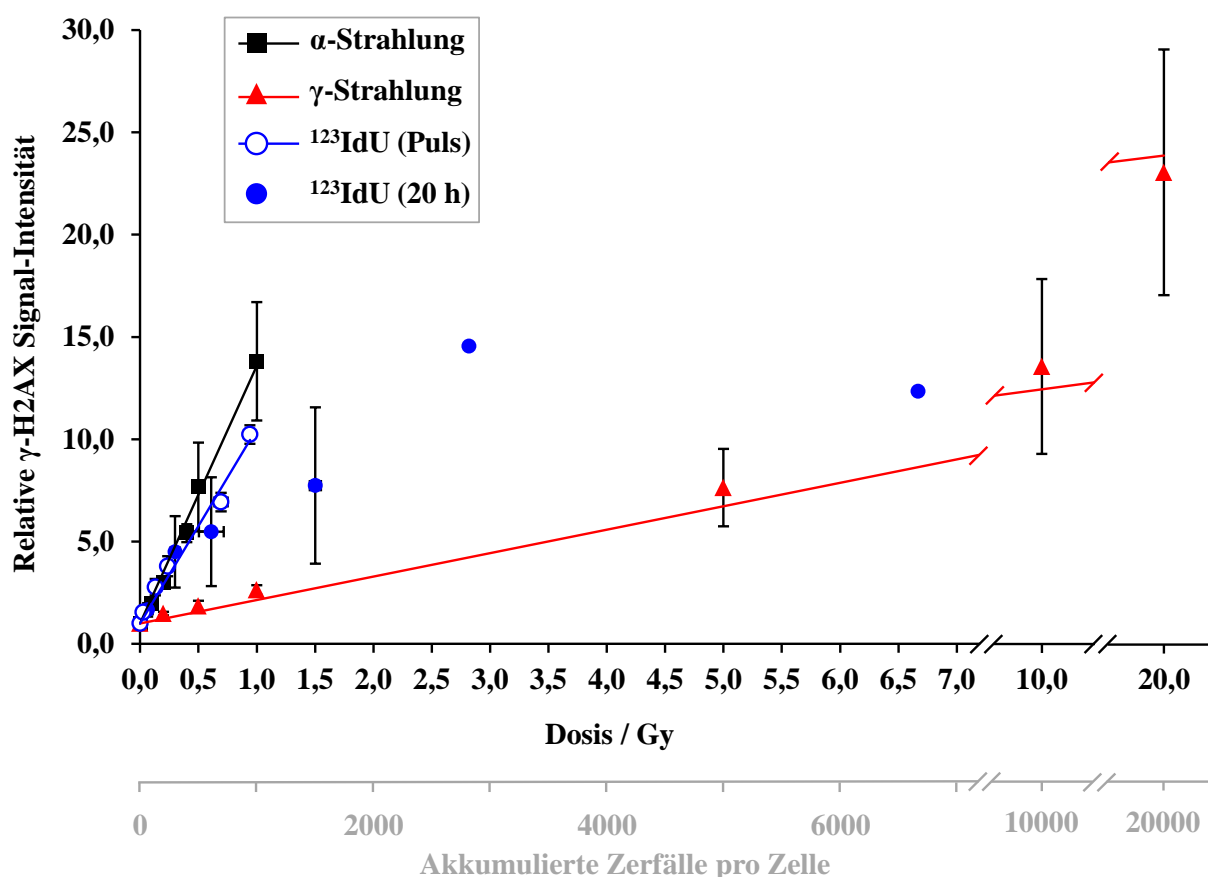


Abb. 16: Durchflusszytometrische Quantifizierung der mittleren  $\gamma$ -H2AX Signalintensität in Jurkat-Zellen 45 min nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung und 45 min nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bzw. 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.

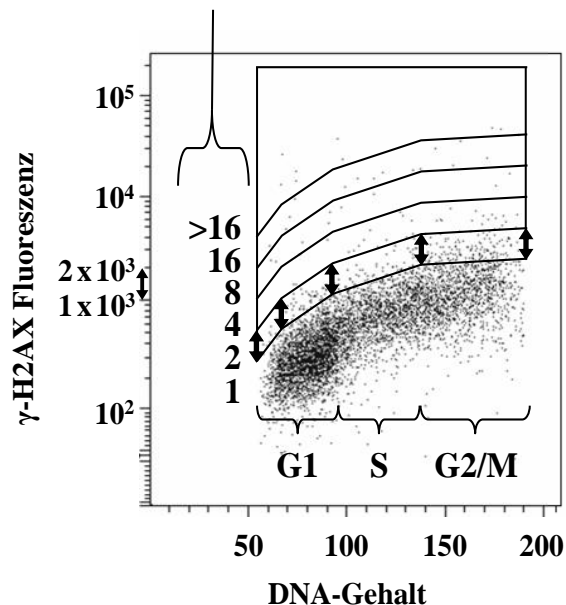
Die relativen  $\gamma$ -H2AX Signalintensitäten nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling und  $\alpha$ -Bestrahlung waren nahezu identisch, aber deutlich höher gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung. (Die von der *BD FACSDiva Software* kalkultierten Median-Werte der  $\gamma$ -H2AX-Fluoreszenz wurden für jede Strahlenqualität relativ zur jeweiligen Kontrolle berechnet, welches den Vergleich der Strahlenqualitäten untereinander erlaubt. Für  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und das  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling wurden Regressionsgeraden kalkultiert. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.)

### 3.3.3 Quantifizierung und Verteilung der zellulären $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz mittels innovativer Durchflusszytometrieanalyse

Die hier angewendete durchflusszytometrische Methode ermöglichte nicht nur Aussagen über die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität sondern auch über die strahlenqualitätsspezifische Verteilung von einzelnen zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignalen in Relation zum DNA-Gehalt bzw. Zellzyklus (Abb. 18). Um diese Verteilung in den *Dotplots* zu quantifizieren, wurde eine von Whalen *et al.* [243] adaptierte, innovative Durchflusszytometrieanalyse angewendet. Hierbei wurden zunächst *Dotplots* unbestrahlter Kontrollzellen genutzt, um  $\gamma$ -H2AX negative Zellen über ein *Gate* zu definieren (siehe Abb. 17). Über diesem *Gate* wurden stufenweise *Gates* angeordnet, die den relativen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der  $\gamma$ -H2AX negativen Kontrollzellen zeigten. Anschließend wurde der

prozentuale Anteil der Zellen in diesen *Gates* quantifiziert. Abb. 18 veranschaulicht, dass die Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale abhängig von der Strahlenqualität war. Das Vorhandensein von vermehrt signalschwachen  $\gamma$ -H2AX negativen Zellen und gleichzeitig vermehrt extrem signalstarken  $\gamma$ -H2AX positiven Zellen in einem *Dotplot* war nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln und  $^{123}\text{IdU}$  entschieden häufiger als nach  $\gamma$ -Bestrahlung.

#### Relativer Anstieg über dem $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollen



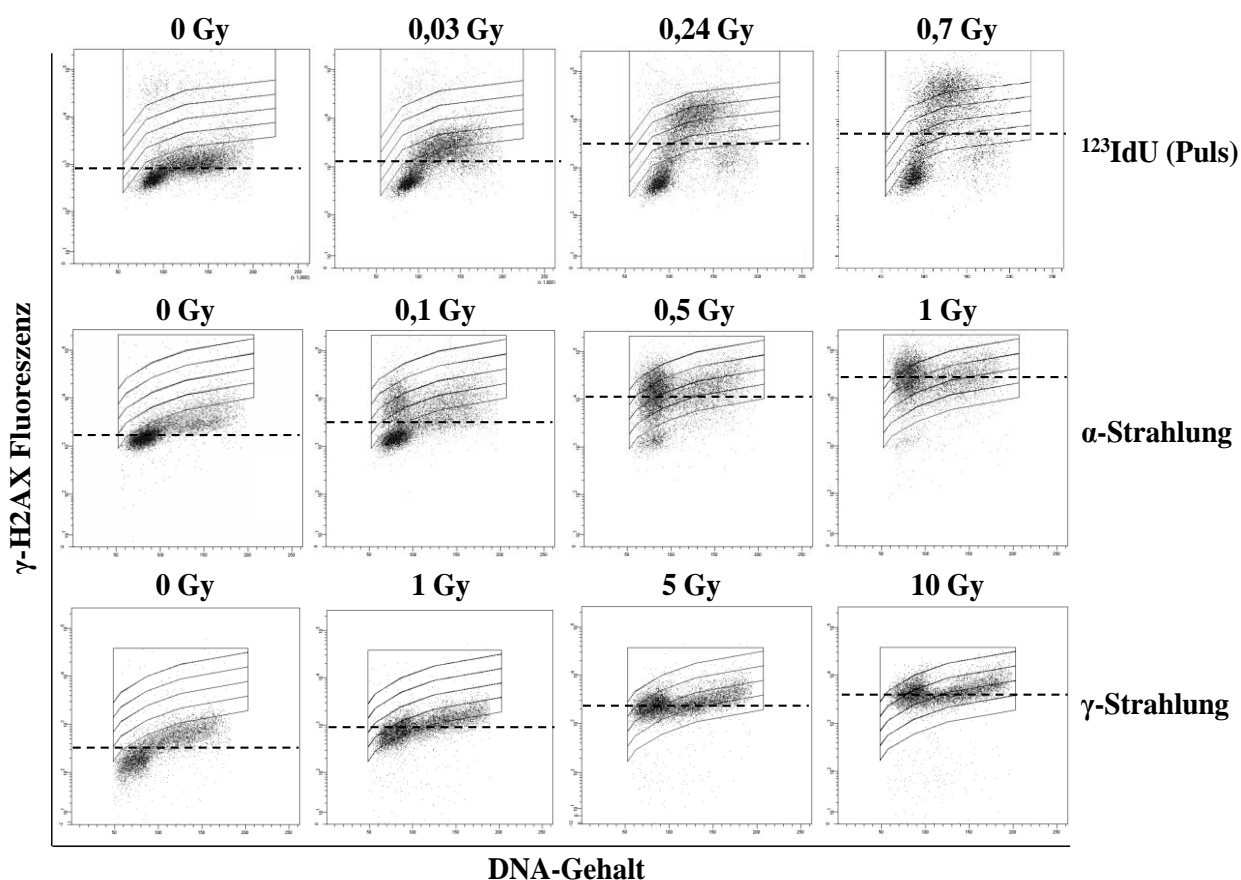
**Abb. 17: Präsentation einer DNA-kombinierten  $\gamma$ -H2AX Analyse von unbestrahlten Kontrollzellen.**

Kontrollzellen wurden genutzt, um  $\gamma$ -H2AX negative Zellen über ein *Gate* zu definieren. Stufenweise angeordnete *Gates* zeigten den relativen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der  $\gamma$ -H2AX negativen Kontrollzellen ( $\uparrow$ ).

Mit anderen Worten war die Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale nach  $\gamma$ -Bestrahlung wesentlich schmäler und eher homogen im Gegensatz zur breiteren und eher heterogenen Verteilung nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln und  $^{123}\text{IdU}$ . Die Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* bestätigte diese Beobachtung durch das steilere Ansteigen und Abfallen der Kurven nach  $\gamma$ -Bestrahlung im Gegensatz zum flacheren Ansteigen und Abfallen der Kurven nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln und  $^{123}\text{IdU}$  (Abb. 19).

Median-Werte der  $\gamma$ -H2AX Intensität, wie in Abb. 16 verwendet, spiegeln nicht die strahlenqualitätsspezifische Variabilität der  $\gamma$ -H2AX Signalintensitäten einzelner Zellen wider. Dieses Defizit war ein wesentlicher Punkt, warum die Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* angewendet wurde. Dies soll nachfolgend exemplarisch erklärt werden. Identische Median-Werte der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität, wie z. B. nach 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, 0,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 0,7 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling (siehe Abb. 16) beobachtet, waren das Resultat von absolut verschiedenen Verteilungen der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale, wie in Abb. 18 ersichtlich. Werden v. a. extrem

signalstarke  $\gamma$ -H2AX Zellen betrachtet, zeigte die Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates*, dass 35%, 12% bzw. nur 6% der exponierten Zellen nach 0,7 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling, 0,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung einen mindestens 16-fachen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollen hatten (Abb. 19). Proportional dazu waren die Anteile der eher fluoreszenzschwachen  $\gamma$ -H2AX Zellen, die als  $\gamma$ -H2AX negativ definiert wurden, verteilt. 37%, 18% bzw. nur 2% der exponierten Zellen nach 0,7 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling, 0,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung waren  $\gamma$ -H2AX negativ (Abb. 19).



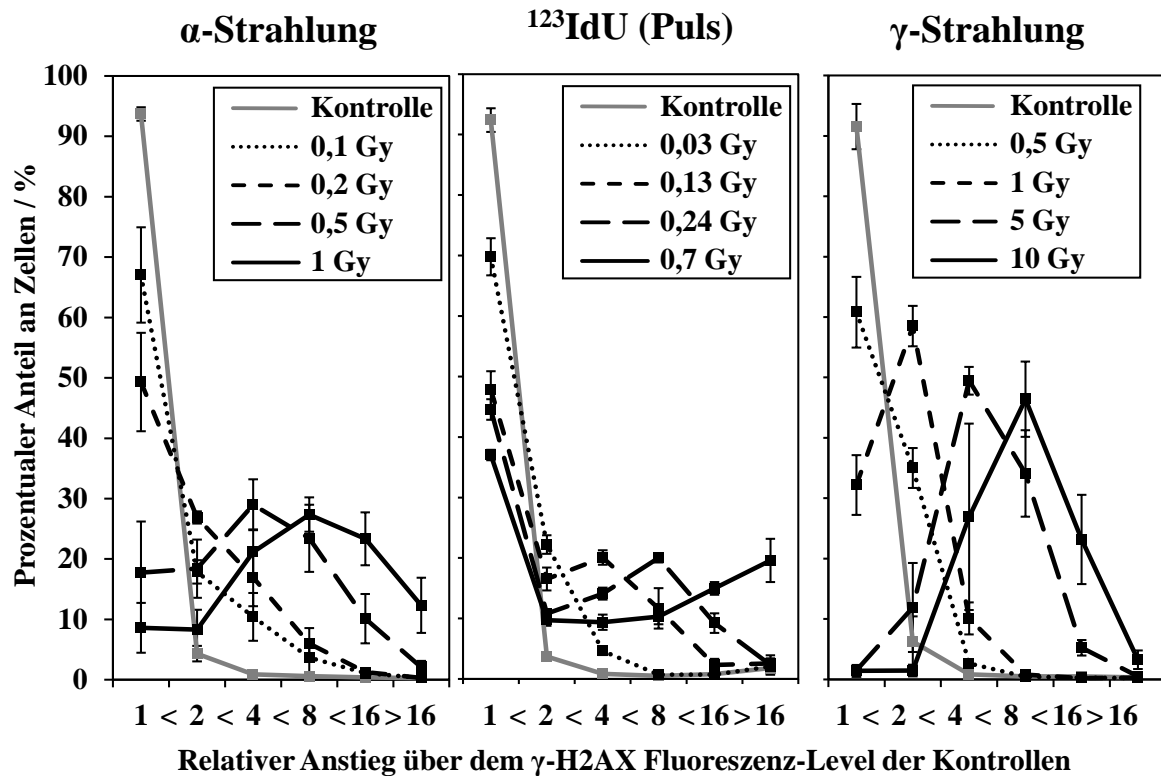
**Abb. 18:** Repräsentative DNA-kombinierte  $\gamma$ -H2AX *Dotplots* von Jurkat-Zellen 45 min nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling mit stufenweise angeordneten *Gates*, die den relativen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der  $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen zeigten.

Die gestrichelte Linie in jedem *Dotplot* entspricht dem Median-Wert des  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignals. Die Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale nach  $\gamma$ -Bestrahlung war eher homogen im Gegensatz zur heterogenen Verteilung nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln und  $^{123}\text{IdU}$ .

Die vermehrt auftretenden  $\gamma$ -H2AX negativen Zellen nach Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  bzw.  $\alpha$ -Partikeln, die sozusagen keinen Anstieg in der  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollzellen zeigten, könnten die Zellfraktionen repräsentieren, die entweder kein  $^{123}\text{IdU}$  inkorporiert hatten bzw. nicht von  $\alpha$ -Partikeln getroffen wurden.

Die Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* bildete die berechneten Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikelstreffer pro Zellkern ab (Abb. 19).

a)



b)

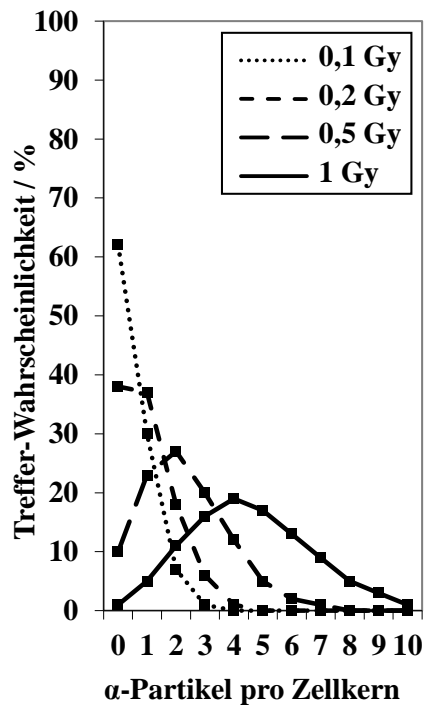
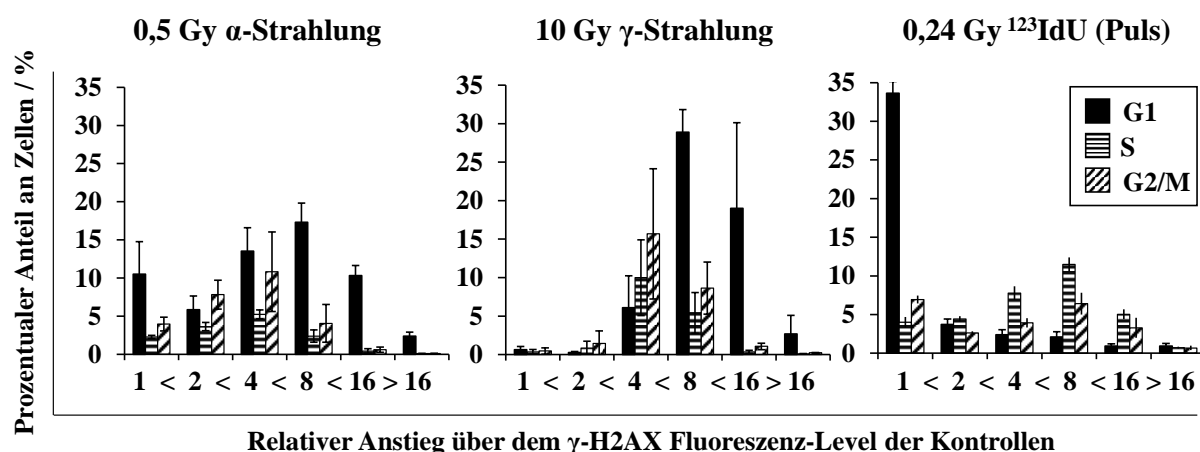


Abb. 19: a) Prozentualer Anteil an Zellen, die den relativen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der  $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen 45 min nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling zeigten. b) Berechnete Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikel-Treffern pro Zellkern [68] (siehe 2.2.5).

Die Standardabweichungen resultieren aus drei unabhängigen Versuchen.

Zuerst fällt auf, dass die Kurvenverläufe dieser Durchflusszytometrieanalyse nach  $\alpha$ -Bestrahlung mit denen der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikeltreffer pro Zellkern ähnlich waren, z. B. lagen in beiden Fällen die Maxima der Kurven nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung beim Zweifachem der Maxima nach 0,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung (Abb. 19). Weiterhin war zu erkennen, dass die Poisson-verteilten Wahrscheinlichkeiten für 2  $\alpha$ -Partikeltreffer pro Zellkern von 7%, 18%, 27% bzw. 11% den Prozentwerten des 4-fachen Anstiegs über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollen von 10%, 17%, 29% bzw. 21% nach 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung ähnelten. Die Poisson-verteilten Wahrscheinlichkeiten für 4  $\alpha$ -Partikeltreffer pro Zellkern von 0%, 1%, 12% bzw. 19% ähnelten den Prozentwerten des 16-fachen Anstiegs über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollen von 1%, 1%, 10% bzw. 23% nach 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung.



**Abb. 20: Prozentualer Anteil an Jurkat-Zellen, die den relativen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der  $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen als Funktion des Zellzyklus nach 0,5 Gy  $\alpha$ -, 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung und 0,24 Gy  $^{125}\text{IdU}$ -Puls-Labeling zeigten.**

Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.

Auch die Poisson-verteilten Wahrscheinlichkeiten für keine  $\alpha$ -Partikeltreffer pro Zellkern von 62%, 38%, 10% bzw. 1% entsprachen in etwa den Prozentwerten der  $\gamma$ -H2AX negativen Zellen mit dem 1-fachen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollen von 67%, 49%, 18% bzw. 9% nach 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung. Schwankungen bzw. Abweichungen ließen sich möglicherweise durch die 15%-ige Unsicherheit der Teilchenflussdichte der  $\alpha$ -Partikel erklären (siehe 2.2.5).

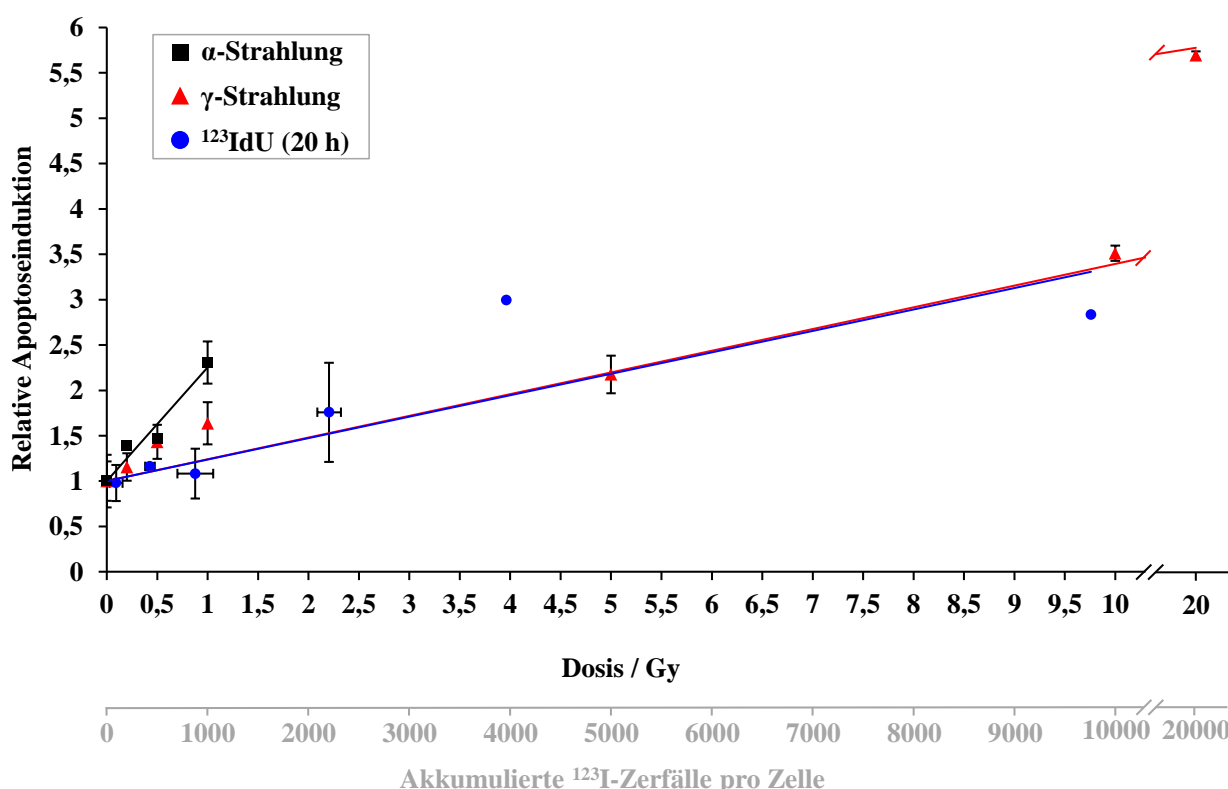
Durch die DNA-kombinierte  $\gamma$ -H2AX Analyse konnte auch die zellzyklusbezogene Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz betrachtet und ausgewertet werden. Bei gleicher Dosis nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung war die Zunahme der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität in bestrahlten G1-Zellen viel stärker als in bestrahlten S- und G2/M-Zellen (Abb. 18). Die

Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* bestätigte das (Abb. 20), z. B. zeigte der maximale Anteil von G1-Zellen nach 0,5 Gy  $\alpha$ - bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung einen 8-fachen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollzellen, während der maximale Anteil von S- und G2/M-Zellen nur einen 4-fachen Anstieg über dem  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der Kontrollzellen zeigte.

Bei den Zellen nach  $^{123}\text{I}$ dU-Puls-Labeling war die zellzyklusbezogene Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz eine völlig andere verglichen mit der nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung. Sowohl die *Dotplots* in Abb. 18 als auch die Durchflusszytometrieanalyse in Abb. 20 zeigte nach  $^{123}\text{I}$ dU-Puls-Labeling eine stark vermehrte Akkumulation von sehr signalstarken  $\gamma$ -H2AX positiven Zellen in der S-Phase gegenüber der G1- und G2/M-Phase,

### 3.4 Bestimmung der Apoptoseinduktion 24 h nach Exposition mittels Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assay

Die Zellen können nach irreparabler DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung mit Apoptoseinduktion reagieren.



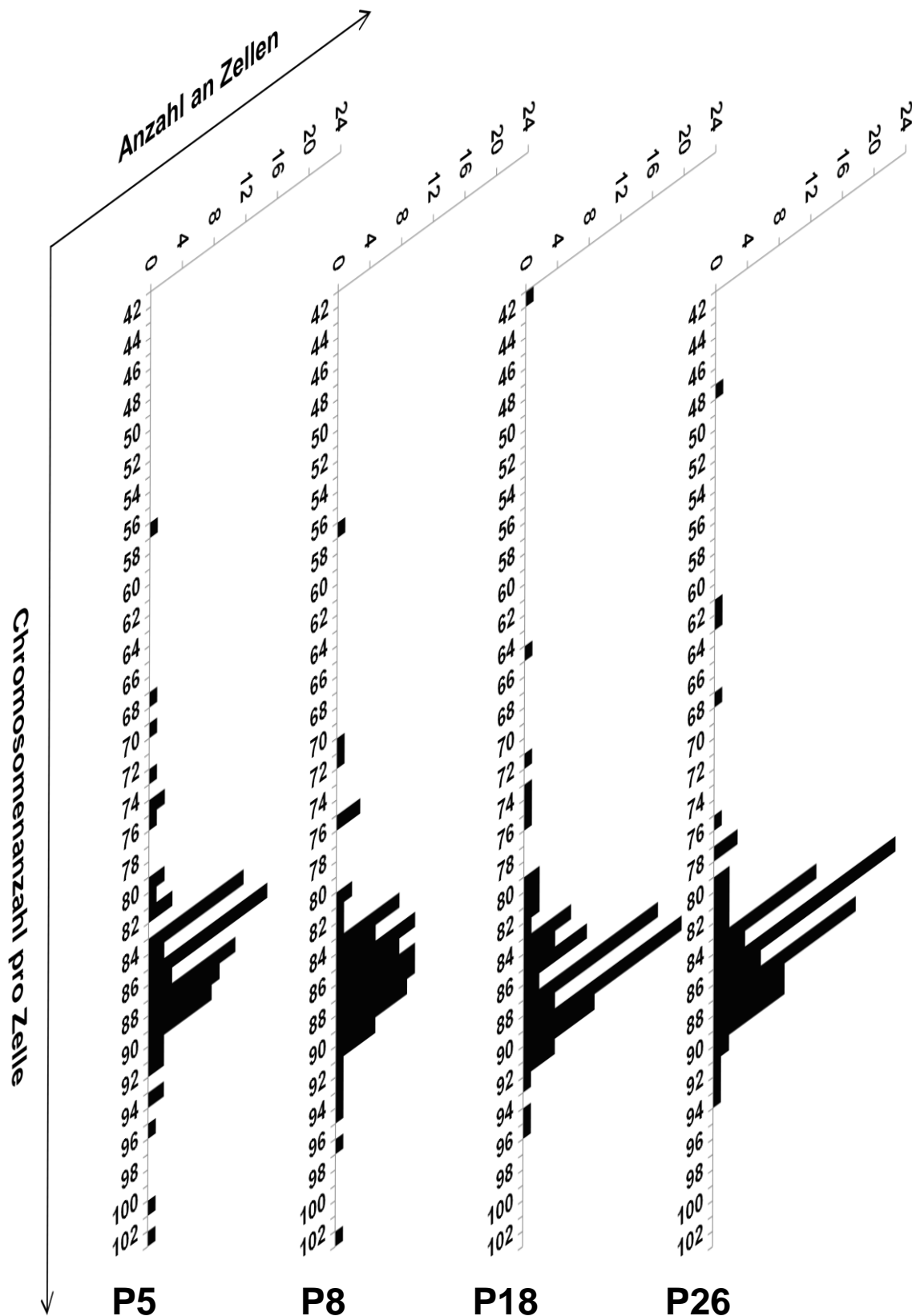
**Abb. 21: Relative Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und 20-stündiger  $^{123}\text{I}$ dU-Exposition.**

Bei gleicher absorbierten Strahlendosis wurde im Vergleich der drei untersuchten Strahlenqualitäten Apoptose am effektivsten durch  $\alpha$ -Bestrahlung induziert. (Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen.)

Die Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen wurde 24 h nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Bestrahlung und 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition mittels Annexin V-FITC Propidiumiodid-Assays durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.2.7). Abb. 21 zeigt, dass für alle drei Strahlenqualitäten 24 h nach Exposition die Apoptoserate dosisabhängig anstieg. Während bei gleichen Dosen die Apoptoseinduktion nach  $\gamma$ -Bestrahlung und  $^{123}\text{IdU}$  Exposition nahezu identisch war, war die Apoptoseinduktion nach  $\alpha$ -Bestrahlung ca. 5-mal effizienter als die der anderen beiden Strahlenqualitäten.

#### **3.5 Bestimmung des Ploidiegrades in Jurkat-Zellen**

Zur Klärung inwieweit eine Veränderung des Ploidiegrades mit ansteigenden Zellkulturpassagen die Genexpressionsanalysen in Jurkat-Zellen stören könnte, wurde die Anzahl der Chromosomen in den Zellpassagen P5, P8, P18 und P26 bestimmt (siehe Abb. 22). Hierfür wurde bei der Untersuchung mittels Colzemid die Verteilung der Metaphase-Chromosomen auf die beiden Tochterkerne verhindert, wodurch die Zellen in der Metaphase angereichert werden [240]. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Zellpassagen eher ein hypotetraploider Karyotyp zu finden war, da die Chromosomenanzahl pro Zelle durchschnittlich kleiner als 92 war. Bei den Zellpassagen P5, P8, P18 bzw. P26 waren die meisten Zellen in Bereichen von 84-90, 84-91, 84-92 bzw. 84-90 Chromosomen pro Zelle zu finden. Nicht nur diese Bereiche waren bei den Zellpassagen P5, P8, P18 bzw. P26 sehr ähnlich, sondern auch die Mittelwerte/Modalwerte der Chromosomenanzahl pro Zelle (86/86, 87/86, 87/90 bzw. 86/86).



**Abb. 22: Untersuchung der Chromosomenanzahl pro Jurkat-Zelle in verschiedenen Zellpassagen.**

Für die Zellpassagen P5, P8, P18 bzw. P26 wurde die Chromosomenanzahl in 82, 81, 90 bzw. 104 Metaphase-Platten bestimmt. In allen Zellpassagen waren eher Jurkat-Zellen mit einem hypotetraploiden Karyotyp zu finden.



### 3.6 Untersuchung der Genexpression nach Exposition mittels Microarrays

#### 3.6.1 Bestimmung von Äqui-Effektdosen für die Microarray-Versuche

Das Konzept der Äqui-Effektdosen wurde bereits unter 1.2.1.2 und 1.4 erklärt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionen nach Exposition mit den drei Strahlenqualitäten zu ermöglichen und um geeignete Dosen für die Microarray-Experimente zu finden, wurden daher mit Hilfe der Dosiseffektkurven für Mikrokernbildung, Apoptoseinduktion sowie der Bildung von  $\gamma$ -H2AX Äqui-Effektdosen bestimmt, die ähnliche Effekt-Level für alle drei Strahlenqualitäten verursachten. Somit wurden mit dem Mikrokern-Assay und der  $\gamma$ -H2AX Induktion die Gentoxizität und mit der Apoptoseinduktion die Zytotoxizität untersucht. Zudem wurden durch die Auswahl dieser drei Endpunkte sowohl frühe als auch späte Strahlenwirkungen nach Exposition erfasst. Dabei zeigten  $\gamma$ -H2AX Foci, die mit DSB die kritischsten Läsionen der DNA darstellen [96, 224], die unmittelbare DNA-Schädigung, so dass  $\gamma$ -H2AX Foci ein relativ frühes Schadensereignis nach Exposition waren. Im Gegensatz dazu stellte die Mikrokernbildung dar, in welchem Ausmaß initiale DSB zu chromosomalen Schädigungen führte. Die Apoptoseinduktion, die nach Anhäufung irreparabler DNA-Schäden erfolgen kann, stellte ein relativ spätes Ereignis nach Exposition dar, so dass die Apoptoseinduktion erst 24 h nach Exposition dokumentiert wurde.

Da die Zellen vom Beginn der Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  bis zu deren Ernte chronisch bestrahlt wurden, akkumulierten sich die Schäden innerhalb dieser Zeit. Daher war es von Vorteil, dass der Mikrokern-Assay diese Akkumulation von chromosomalen Schäden in Form von Mikrokernen nach Exposition abbildete. Zudem wurde beim durchgeführten Apoptose-Assay methodisch der Erhalt apoptotischer Zellen ermöglicht, da die Jurkat-Suspensionszellen nach jedem Schritt zentrifugiert wurden. Somit wurden auch spätapoptotische Zellen betrachtet, die sich womöglich in einer adhärennten Zellkultur abgelöst hätten und durch die Waschschrte verloren gegangen wären.

Anhand der Dosiseffektkurven für Mikrokernbildung (Abb. 13), Apoptoseinduktion (Abb. 21) sowie der mittleren  $\gamma$ -H2AX Signalintensität (Abb. 16) wurden Äqui-Effektdosen bestimmt. Bezüglich der Äqui-Effektdosen für die Induktion von  $\gamma$ -H2AX wurde die durchflusszytometrische Quantifizierung der mittleren  $\gamma$ -H2AX Signalintensität als geeigneter befunden als die mikroskopische Bestimmung der mittleren Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci, da die durchflusszytometrische Quantifizierung die LET Abhängigkeit von Foci-Größe und -Intensität beachtete. In Bezug auf die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität 45 min nach Exposition wurden Äqui-Effektdosen nach 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung, 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy

$^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 5 Gy  $\gamma$ -Strahlung und 0,5 Gy  $\alpha$ -Strahlung bzw. 0,8 Gy  $\gamma$ -Strahlung, 0,1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 0,05 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition identifiziert (Abb. 23).

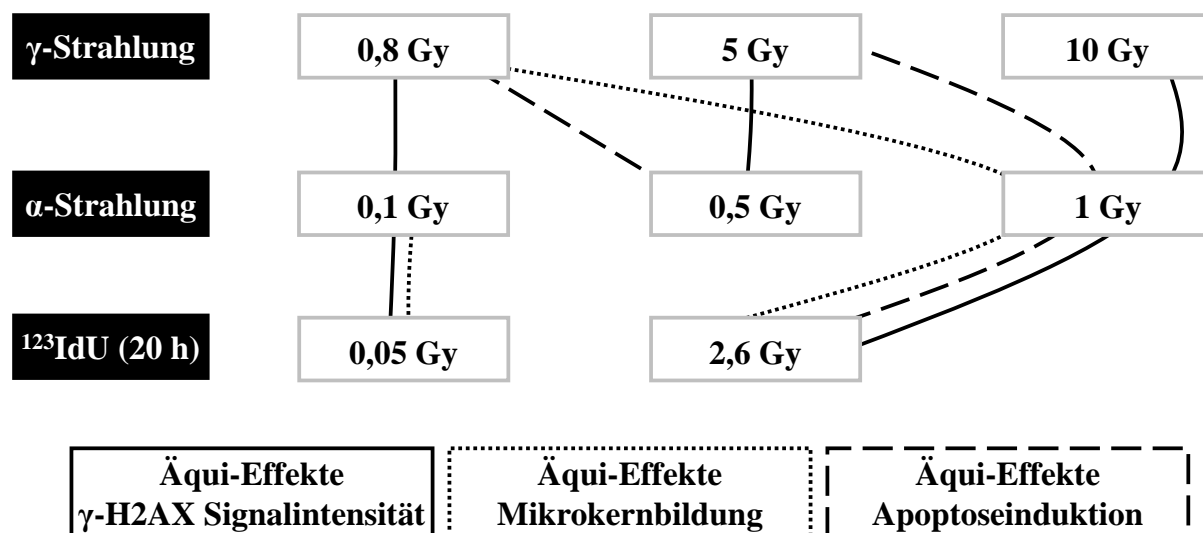


Abb. 23. Bestimmung von Äqui-Effektdosen in Jurkat-Zellen für alle drei Strahlenqualitäten anhand Apoptoseinduktion, Mikrokernbildung und mittlerer  $\gamma$ -H2AX Intensität.

In Bezug auf die Apoptoseinduktion 24 h nach Exposition waren die biologischen Effekte nach 5 Gy  $\gamma$ -Strahlung, 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 0,8 Gy  $\gamma$ -Strahlung und 0,5 Gy  $\alpha$ -Strahlung ähnlich, so dass diese Dosen als Äqui-Effektdosen bestimmt wurden.

Bezüglich der Mikrokernbildung 24 h nach Exposition wurden Äqui-Effektdosen nach 0,8 Gy  $\gamma$ -Strahlung, 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 0,1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 0,05 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition identifiziert.

### 3.6.2 Signifikant veränderte Genexpressionen nach Exposition

Die zuvor bestimmten Äqui-Effektdosen (siehe 3.6.1) wurden für die vergleichende Genexpressionsanalyse mittels Microarrays verwendet. Um untersuchen zu können, welche Wirkungen die applizierten Strahlendosen der verschiedenen Strahlenqualitäten auf das Jurkat-Transkriptom ausübten, wurden die Microarrays dahingehend ausgewertet, signifikant veränderte Gene im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle (0 Gy) zu identifizieren. Dabei wurden die p-Werte der Gene aus der Varianzanalyse mittels FDR (*False discovery rate*) nach der Methode von Benjamini-Hochberg Fallzahl-korrigiert. Die Gene, die einen  $\text{FDR} < 0,15$  zeigten, wurden als statistisch signifikant erachtet, wobei FDR-Werte von 0,1-0,25 bei Microarray-Genexpressionsstudien durchaus üblich sind [164, 196, 207, 210].

Danach wurden die Gene dahingehend gefiltert, dass nur diejenigen in der weiteren Analyse verwendet wurden, die eine Hoch- bzw. Herunterregulation mit einem Expressionsunterschied  $> 1,5$ -fach gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle zeigten. Zunächst wurden Microarray-Analysen mit jeweils drei biologische Replikaten für 6 h nach 0; 0,8; 5 und 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 6 h nach 0; 0,1; 0,5 und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 6 h nach 0; 0,05 und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition durchgeführt. Es wurden 72 bzw. 344 signifikant regulierte Gene nach Exposition mit 0,05 Gy bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$  identifiziert, wobei die Vielfache der Genexpressionsveränderungen von -3,4 bis 5,4 bzw. -4 bis 6,2 variierten (Tab. 4).

**Tab. 4: Signifikant regulierte Gene in Jurkat-Zellen nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten**

	<b>Signifikant regulierte Gene</b>	<b>Expressionsveränderungen</b>	<b>Unkorrigierte p-Werte</b>
0,05 Gy $^{123}\text{IdU}$ (6 h nach 20 h Exp.)	72	-3,4-fach bis 5,4-fach	1,2E-07 bis 1,2E-02
2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ (6 h nach 20 h Exp.)	344	-4-fach bis 6,2-fach	1,2E-07 bis 1,2E-02
0,8 Gy $\gamma$ -Strahlung (6 h)	14	-3,1-fach bis 8,4-fach	6,2E-07 bis 4,4E-04
5 Gy $\gamma$ -Strahlung (6 h)	42	-3,8-fach bis -1,5-fach	6,2E-07 bis 4,4E-04
10 Gy $\gamma$ -Strahlung (6 h)	0	-	-
10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)	1321	-5,4-fach bis 17,7-fach	1,5E-08 bis 2,3E-02
0,1 Gy $\alpha$ -Strahlung (6 h)	0	-	-
0,5 Gy $\alpha$ -Strahlung (6 h)	1	1,9-fach	2,2E-06
1 Gy $\alpha$ -Strahlung (6 h)	1	2,3-fach	6,6E-06
1 Gy $\alpha$ -Strahlung (24 h)	596	-4,5-fach bis 8,1-fach	1,9E-05 bis 4,0E-02

Es konnte so gut wie keine signifikante Änderung der Genexpression 6 h nach 0,1 Gy; 0,5 Gy und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung festgestellt werden (Tab. 4). Wenige bzw. keine signifikant regulierten Gene wurden 6 h nach 0,8; 5 bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung dokumentiert, im Detail waren nur 14 bzw. 42 Gene signifikant reguliert nach 0,8 bzw. 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung (Tab. 4). Da 6 h nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung so gut wie keine bzw. nur wenige Gene signifikant reguliert waren, wurden zusätzliche Microarray-Analysen 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt. So wurden 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ - bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 596 bzw. 1321 signifikant regulierte Gene identifiziert, wobei die Vielfache der Genexpressionsveränderungen von -4,5 bis 8,1 bzw. -5,4 bis 17,7 variierten. Zusammenfassend zeigte sich, dass eine signifikant veränderte Genexpression häufiger zu einem späten (24 h) als zu einem frühen (6 h) Zeitpunkt nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung beobachtet

wurde. Die unkorrigierten p-Werte der Gene, die nach Fallzahl-Korrektur mit einem FDR  $< 0,15$  als statistisch signifikant erachtet wurden, schwankten zwischen  $1,5 \times 10^{-8}$  und  $4 \times 10^{-2}$  (Tab. 4) und lagen damit unterhalb von 0,05.

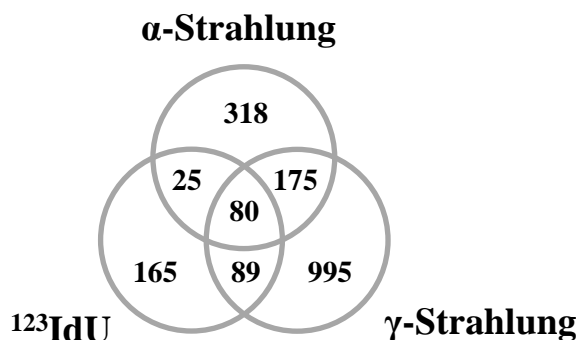


Abb. 24: Venn-Diagramm der signifikant regulierten Gene in Jurkat-Zellen nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten.

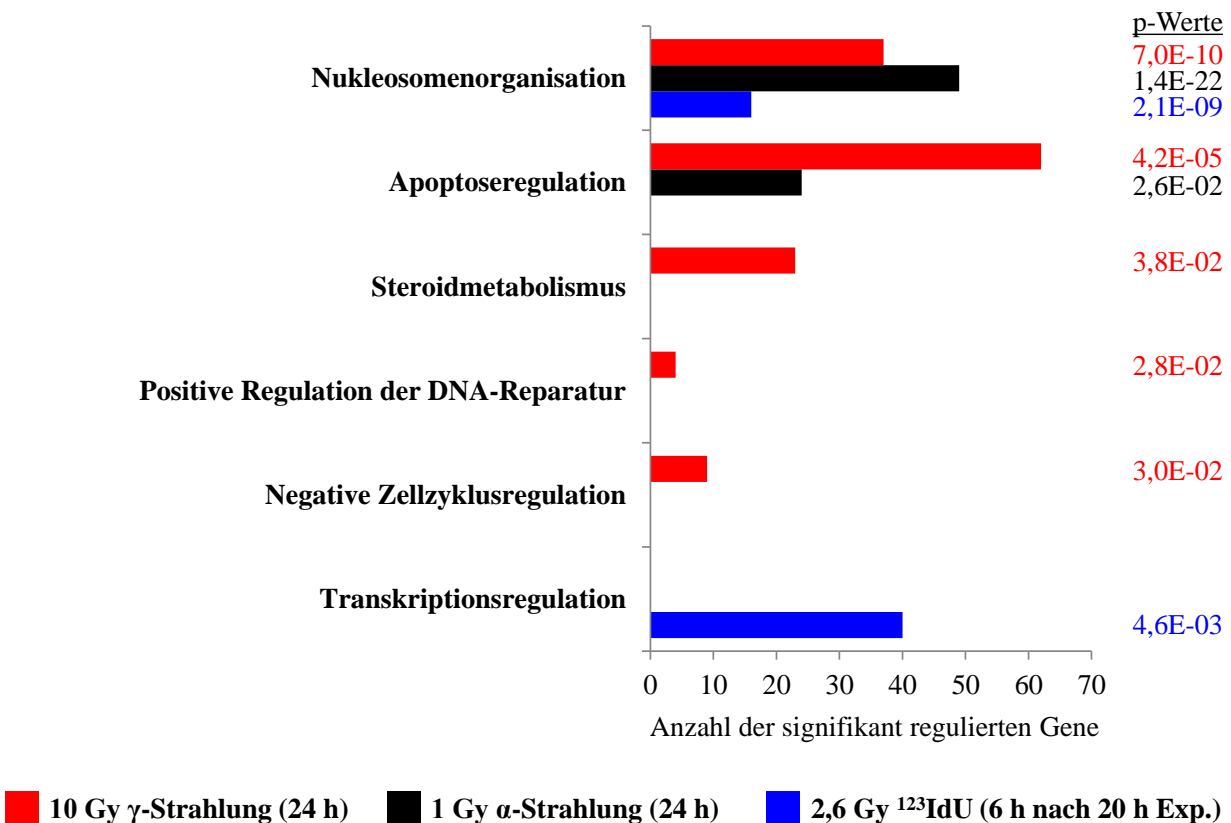
Das Venn-Diagramm indiziert die Anteile der Gene, die nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten gemeinsam bzw. exklusiv reguliert wurden. Demnach waren nur 80 Gene gemeinsam reguliert, während 165, 318 bzw. 995 Gene exklusiv nach Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$ , α- bzw. γ-Strahlung reguliert waren (Abb. 24). 255, 105 bzw. 169 Gene waren nach Exposition mit α- und γ-Strahlung, α-Strahlung und  $^{123}\text{IdU}$  bzw. γ-Strahlung und  $^{123}\text{IdU}$  gemeinsam reguliert.

### 3.6.3 Signifikant induzierte biologische Prozesse und Signalwege nach Exposition

Für die Analyse, welche biologischen Prozesse und Signalwege signifikant überrepräsentiert waren, wurden die Genlisten der signifikant veränderten Gene in die online-Datenbank DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) eingefügt. Eine Auflistung der den einzelnen biologischen Prozessen und Signalwegen zugeordneten, signifikant veränderten Genen befindet sich im Anhang. Bei den mittels DAVID durchgeführten Analysen wurde zunächst registriert, dass signifikant überrepräsentierte biologische Prozesse und Signalwege nur 24 h nach 10 Gy γ- und 1 Gy α-Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zu finden waren. Bei diesen drei Dosiswerten der drei Strahlenqualitäten handelt es sich um Äqui-Effektdosen bezüglich der γ-H2AX Bildung.

#### Signifikant induzierte biologische Prozesse nach Exposition:

Die biologischen Prozesse betreffend wurden die niedrigsten p-Werte mit  $1,4 \times 10^{-22}$ ,  $7 \times 10^{-10}$  bzw.  $2,1 \times 10^{-9}$  nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition der Nukleosomenorganisation zugeordnet (Abb. 25). Die p-Werte der anderen regulierten biologischen Prozesse waren mit  $4,2 \times 10^{-5}$  bis  $2,6 \times 10^{-2}$  weitaus höher (Abb. 25).



**Abb. 25: Darstellung der signifikant regulierten biologischen Prozesse in Jurkat-Zellen 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ - und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.**

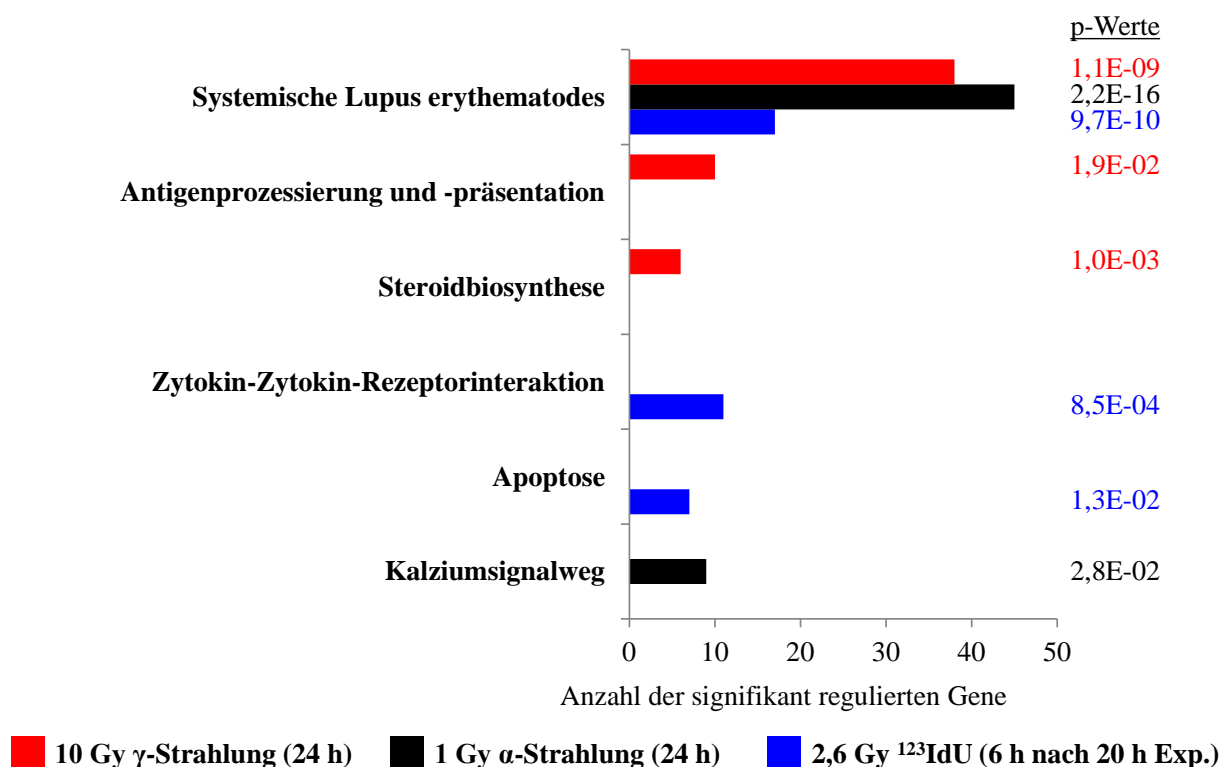
Die rechts neben den Balken befindlichen Zahlen geben die p-Werte der jeweiligen biologischen Prozesse an.

Die geringen p-Werte wiesen darauf hin, dass die Nukleosomenorganisation mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit bei allen drei Strahlenqualitäten reguliert wurde. Es war auffällig, dass die Anzahl der Gene, die der Nukleosomenorganisation zugeordnet wurde, nach 1 Gy  $\alpha$ - bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung dreimal bzw. mehr als doppelt so hoch war wie nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. Während nach Exposition mit 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$  die Transkription exklusiv signifikant reguliert wurde, wurde nach 10 Gy  $\gamma$ - und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung die Regulation der Apoptose sowie nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung der Steroidmetabolismus, die positive Regulation der DNA-Reparatur und die negative Zellzyklusregulation exklusiv reguliert (Abb. 25).

Auffällig war, dass nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung ca. 2,6-mal mehr apoptoserelevante Gene reguliert waren als nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung.

#### Signifikant induzierte Signalwege nach Exposition:

Die Signalwege betreffend wurden die niedrigsten p-Werte mit  $2,2 \times 10^{-16}$ ,  $9,7 \times 10^{-10}$  bzw.  $1,1 \times 10^{-9}$  nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung dem Systemische Lupus erythematoses Signalweg zugeordnet (Abb. 26), welches darauf hinwies, dass dieser Signalweg mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit bei allen drei Strahlenqualitäten reguliert wurde.



**Abb. 26: Darstellung der signifikant regulierten Signalwege in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.**

Die rechts neben den Balken befindlichen Zahlen geben die p-Werte der jeweiligen biologischen Prozesse an.

Die p-Werte der anderen regulierten Signalwege waren mit  $8,5 \times 10^{-4}$  bis  $2,8 \times 10^{-2}$  weitaus höher (Abb. 26). Markant war, dass die Anzahl der Gene, die dem Systemische Lupus erythematoses Signalweg zugeordnet wurden, nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung und 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung mehr als doppelt so hoch war wie nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition (Abb. 26). Exklusiv reguliert waren die Signalwege Antigenprozessierung und -präsentation sowie die Steroidbiosynthese nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion und Apoptose nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. der Kalziumsignalweg nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung (Abb. 26).

Auffallend war, dass Apoptose als biologischer Prozess, nicht aber als Signalweg, nach 10 Gy  $\gamma$ - und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung signifikant reguliert war, während Apoptose als Signalweg, nicht aber als biologischer Prozess nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition signifikant reguliert war (siehe Abb. 25 und 26).

#### **3.6.3.1 Detaillierte Analyse der Nukleosomenorganisation und des Systemische Lupus erythematoses Signalwegs**

Wie die bisherigen Analysen zeigten, wurde sowohl die Nukleosomenorganisation als auch der Systemische Lupus erythematoses Signalweg mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit bei allen drei Strahlenqualitäten reguliert. Die Nukleosomenorganisation bzw. den Systemische Lupus erythematoses Signalweg betreffend wurden 16 bzw. 17 Gene nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, 49 bzw. 45 Gene nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung und 37 bzw. 38 Gene nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant reguliert. Somit war bezogen auf die einzelne Strahlenqualität die Anzahl der Gene bei der Nukleosomenorganisation und dem Systemische Lupus erythematoses Signalweg nahezu gleich.

Sowohl beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg als auch bei der Nukleosomenorganisation spielte die Histongene-Regulation eine prominente Rolle. Im Detail waren 43, 33 bzw. 15 Histongene nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition sowohl beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg als auch bei der Nukleosomenorganisation gemeinsam reguliert (Abb. 27). Nur 5, 4 bzw. 1 Histongen(e) war(en) nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ausschließlich bei der Nukleosomenorganisation verändert (Abb. 27).

Außerdem war auffällig, dass 93-98% der Histongene nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg und bei der Nukleosomenorganisation herunterreguliert waren (Abb. 27).

Auch die Strahlenqualitäten untereinander vergleichend gab es gemeinsam regulierte Histongene. Sowohl beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg als auch bei der Nukleosomenorganisation wurden 12 identische Histongene bei allen 3 Strahlenqualitäten gemeinsam reguliert (Abb. 27). Zusätzlich waren 21 bzw. 22 Histongene nach 1 Gy  $\alpha$ - und 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg bzw. bei der Nukleosomenorganisation gemeinsam reguliert.

	2,6 Gy $^{125}\text{I}$ IdU (6 h nach 20 h Exp.)	1 Gy $\alpha$ -Strahlung (24 h)	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)	2,6 Gy $^{125}\text{I}$ IdU (6 h nach 20 h Exp.)	1 Gy $\alpha$ -Strahlung (24 h)	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
	Nukleosomen-Organisation			Systemische Lupus erythematoses		
C2				↑		↑
C5					↑	↑
CTSG					↑	↑
H1F0		↓				
H1FX	↓	↓				
HIST1H1B		↓	↓			
HIST1H1C			↓			
HIST1H1D		↓	↓			
HIST1H1E		↓	↓			
HIST1H2AA		↓			↓	
HIST1H2AB		↓	↓		↓	↓
HIST1H2AD		↓			↓	
HIST1H2AE		↓			↓	
HIST1H2AG		↓	↓		↓	↓
HIST1H2AH		↓	↓		↓	↓
HIST1H2AJ		↓	↓		↓	↓
HIST1H2AK		↓	↓		↓	↓
HIST1H2AL		↓			↓	
HIST1H2AM		↓	↓		↓	↓
HIST1H2BB	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BC		↓	↓		↓	↓
HIST1H2BD	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BE	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BF	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BG	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BH	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BI	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BK	↓			↓		
HIST1H2BL	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BM	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H2BN		↓	↓		↓	↓
HIST1H2BO	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST1H3B		↓	↓		↓	↓
HIST1H3D		↓	↓		↓	↓
HIST1H3F	↓	↓		↓	↓	
HIST1H3G		↑			↑	
HIST1H4A			↑			↑
HIST1H4B		↓			↓	
HIST1H4C		↓			↓	
HIST1H4D		↓	↓		↓	↓
HIST1H4E		↓	↓		↓	↓
HIST1H4F		↓			↓	
HIST1H4G		↓			↓	
HIST1H4H		↓	↓		↓	↓
HIST1H4I		↓	↓		↓	↓
HIST1H4J		↓	↓		↓	↓
HIST1H4K		↓	↓		↓	↓
HIST1H4L		↓			↓	
HIST2H2AB		↓	↓		↓	↓
HIST2H2AC		↓	↓		↓	↓
HIST2H2BE	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HIST2H3A	↑		↑	↑		↑
HIST2H4B		↓			↓	
HIST3H2A		↓	↓		↓	↓
HIST3H2BB	↓	↓	↓	↓	↓	↓
HLA-DQA						↑
HLA-DRB5						↑
NFE2		↑				
TNF				↓		



**Abb. 27: Analyse der signifikant regulierten Gene bezüglich der Nukleosomenorganisation und des Systemische Lupus erythematoses Signalwegs in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle. Dunkelgrau bzw. Hellgrau gekennzeichnet sind die Gene, die gemeinsam nach Exposition mit allen drei bzw. mit zwei Strahlenqualitäten beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg und/oder bei der Nukleosomenorganisation reguliert wurden. Innerhalb des gestrichelten Rahmens sind die Histongene zu finden, die bezogen auf eine Strahlenqualität sowohl beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg als auch bei der Nukleosomenorganisation reguliert wurden.

Die Nukleosomenorganisation und den Systemische Lupus erythematoses Signalweg betreffend waren nur 0%, 5-9% bzw. 23-26% der Histongene exklusiv nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition,  $\gamma$ -Bestrahlung bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung reguliert.

#### 3.7 Kandidatengene, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben

Ein Hauptziel der Arbeit war es Kandidatengene zu finden, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben. Da bei der Analyse der Genexpression mittels Microarrays 6 h nach 0,1; 0,5; 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, 6 h nach 0,8; 5; 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung und 6 h nach 0,05 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition keine bzw. nur wenige signifikant regulierte Gene identifiziert wurden (siehe 3.6.2.), wurde eine neue Analyse der Genexpressionsdaten angewendet, die mehr Gene in die Analyse mit einbezog.

Im Gegensatz zur ersten Analyse der Genexpression, die u. a. dazu diente signifikant induzierte biologische Prozesse und Signalwege zu identifizieren (siehe 3.6.2), wurde bei der hier beschriebenen Analyse nicht mit Fallzahl-korrigierten p-Werten sondern mit nicht-korrigierten p-Werten gearbeitet, um Kandidatengene zu finden, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlaubten. Dieses Absenken des Signifikanz-Levels war möglich, da nachfolgend die Genexpression der ausgewählten Kandidatengene mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) überprüft wurde. Zunächst wurden demnach die Gene eines einzelnen Dosiswert einer Strahlenqualität dahingehend gefiltert, dass nur Gene mit einem nicht-korrigiertem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant erachtet und in der weiteren Analyse verwendet wurden. Dann wurden die Gene dahingehend herausgefiltert und in der weiteren Analyse verwendet, die eine signifikante Hoch- bzw. Herunterregulation mit einem Expressionsunterschied  $> 1,5$ -fach gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle zeigten.

Anschließend wurden die gefilterten Gene dieses einen Dosiswertes dieser ersten Strahlenqualität mit einem Dosiswert einer zweiten Strahlenqualität verglichen, wobei nun nur Gene beachtet wurden, die bei der zweiten Strahlenqualität keine Regulation (Expressionsunterschied =  $1\text{-fach} \pm 0,1$ ) bzw. eine gegensätzliche Regulation gegenüber der ersten Strahlenqualität zeigten. Schließlich wurde mittels dieses Algorithmus jeder Dosiswert

einer Strahlenqualität mit jedem Dosiswert einer der beiden anderen Strahlenqualitäten verglichen.

Ein weiteres Kriterium beim Vergleich zweier einzelner Dosiswerte der beiden ausgewählten Strahlenqualitäten war, dass sich die Genexpressionen der unbestrahlten Kontrollen der beiden für den Vergleich ausgewählten Strahlenqualitäten ähneln sollten (Expressionsunterschied 1-fach  $\pm$  0,25). Zudem wurden zellzyklusregulierte Gene ausgeschlossen, wenn es sich bei einer der beiden zu vergleichenden Strahlenqualitäten um die  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition handelte, da  $^{123}\text{IdU}$ -exponierte Zellen im Zellzyklus synchronisiert wurden.

**Tab. 5:** Nach Analyse der Microarray-Daten wurden mögliche Kandidatengene für die Diskriminierung der Strahlenqualitäten identifiziert und nachfolgend mit Hilfe der quantitativen RT-PCR überprüft.

<b><math>\gamma</math>-Strahlung vs. <math>^{123}\text{IdU}</math></b>	<b><math>\gamma</math>- vs. <math>\alpha</math>-Strahlung</b>	<b><math>\alpha</math>-Strahlung vs. <math>^{123}\text{IdU}</math></b>
6 h nach $\gamma$ -Bestrahlung vs. 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>PPP1R14C</i></li> <li>• <i>TNFAIP8L1</i></li> </ul>	6 h nach $\gamma$ -Bestrahlung vs. 6 h nach $\alpha$ -Bestrahlung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>REEP1</i></li> <li>• <i>FAM83D</i></li> </ul>	6 h nach $\alpha$ -Bestrahlung vs. 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>TNFAIP8L1</i></li> </ul>
24 h nach $\gamma$ -Bestrahlung vs. 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>DNAJC1</i></li> <li>• <i>VWF</i></li> <li>• <i>PRTFDC1</i></li> <li>• <i>SMPD1</i></li> <li>• <i>SNTB1</i></li> </ul>	24 h nach $\gamma$ -Bestrahlung vs. 24 h nach $\alpha$ -Bestrahlung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>FAM57B</i></li> <li>• <i>KLF10</i></li> </ul>	24 h nach $\alpha$ -Bestrahlung vs. 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition:

Die Genexpression 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition wurde sowohl mit der Genexpression 6 h als auch 24 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung verglichen. Der Grund hierfür war, dass Zellen, die am Anfang der 20-stündigen Exposition  $^{123}\text{IdU}$  inkorporierten und somit bis zur Ernte bis zu insgesamt 26 h mit  $^{123}\text{IdU}$  bestrahlt wurden, eher mit den Zellen 24 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung vergleichbar waren. Währenddessen waren Zellen, die am Ende der 20-stündigen Exposition  $^{123}\text{IdU}$  inkorporierten und somit bis zur Ernte nur ca. 6 h mit  $^{123}\text{IdU}$  bestrahlt wurden, eher mit den Zellen 6 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung vergleichbar.

Mittels der hier beschriebenen tiefgehenden Analyse der Microarray-Daten wurden Kandidatengene identifiziert, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlaubten (Tab. 5). Hierbei wurden 7 Gene, 4 Gene bzw. 1 Gen gefunden, die die Diskriminierung

$\gamma$ -bestrahlter von  $^{123}\text{IdU}$ -exponierter,  $\gamma$ -bestrahlter von  $\alpha$ -bestrahlter bzw.  $\alpha$ -bestrahlter von  $^{123}\text{IdU}$ -exponierter Zellen auf Ebene der Microarray-Daten erlaubten.

Nachfolgend wurde die Genexpression der ausgewählten Kandidatengene mittels qRT-PCR bestimmt und mit den Genexpressionsdaten aus der Microarray-Analyse verglichen.

#### 3.7.1 QRT-PCR der identifizierten Kandidatengene

Die Genexpression der ausgewählten Kandidatengene, die auf Basis der Microarray-Daten die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlaubten (Tab. 5), wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei wurde jede Strahlenqualität mit jeder anderen verglichen, so dass sich drei Paare,  $\gamma$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition,  $\gamma$ - vs.  $\alpha$ -Strahlung und  $\alpha$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, bildeten. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Daten der qRT-PCR und den Microarray-Daten zu ermöglichen, wurden die Daten relativ zu einer der beiden unbestrahlten Kontrollen der beiden zu vergleichenden Strahlenqualitäten dargestellt. Dadurch war es auch möglich die basale Genexpression der beiden unbestrahlten Kontrollen der beiden zu vergleichenden Strahlenqualitäten miteinander zu vergleichen. In Bezug auf die qRT-PCR-Daten wurde ein Genexpressionsunterschied  $\leq 1,1$ -fach gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle als Nichtregulation des Gens gewertet, alle Genexpressionsunterschiede  $> 1,1$ -fach wurden, je nachdem wie das Gen reguliert war, als Herunter- bzw. Hochregulation gewertet.

##### $\alpha$ -Strahlung vs. $^{123}\text{IdU}$ :

Die Daten der qRT-PCR zeigten, dass das Gen *TNFAIP8LI* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,45-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war. Währenddessen war es 6 h nach 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung 1,45-fach signifikant bzw. 1,35-fach gegenüber der eigenen Kontrolle herunterreguliert (Abb. 28). Der direkte Expressionsunterschied zwischen 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und 6 h nach 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung war 2-fach bzw. 1,9-fach und in beiden Fällen signifikant. Die unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten waren in ihrer Genexpression nahezu identisch.

Die *TNFAIP8LI*-Genexpression war bezogen auf die einzelnen Datenpunkte bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen sehr ähnlich (Abb. 28). In beiden Fällen war *TNFAIP8LI* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition signifikant hochreguliert, derweil war es 6 h nach 0,5 bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung herunterreguliert, bezüglich der qRT-PCR-Daten bzw. der Microarray-Daten nach 0,5 Gy bzw. nach 1 Gy sogar signifikant.

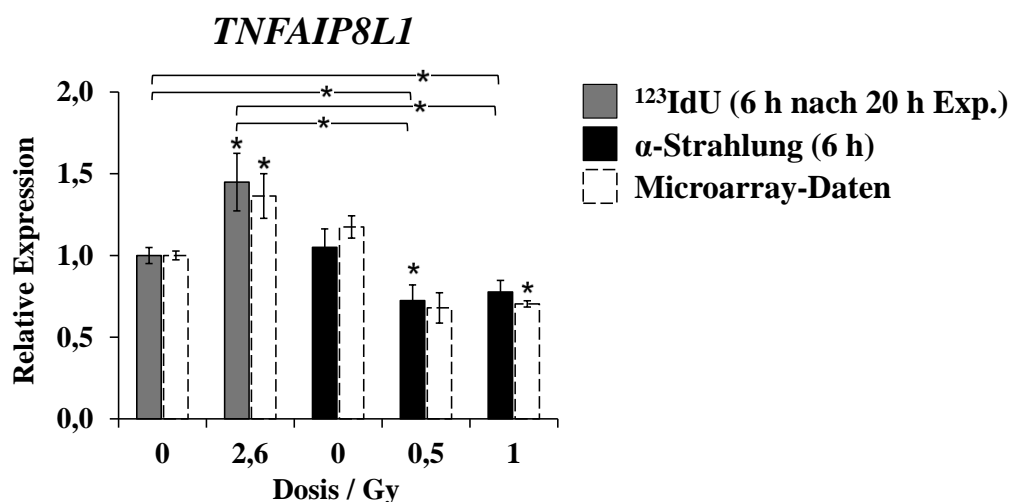


Abb. 28: Relative Expression des Gens *TNFAIP8L1* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 6 h nach 0,5 und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung.

Die grau bzw. schwarz gefüllten Balken mit durchgezogener Linie bilden die Daten der qRT-PCR ab. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$ ; wenn sich \* allein über einem Datenbalken befindet, dann ist die Signifikanz gegenüber der eigenen Kontrolle gekennzeichnet. Bezüglich der qRT-PCR-Daten wurden auch noch andere Signifikanzen mit Klammern gekennzeichnet.

Auch die Vielfache der Genexpressionen der Datenpunkte relativ zu der unbestrahlten Kontrolle ( $^{123}\text{IdU}$ ), zu der die anderen Datenpunkte ins Verhältnis gesetzt wurden, waren bei qRT-PCR bzw. Microarray sehr ähnlich (Abb. 28).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *TNFAIP8L1* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\alpha$ -Strahlung gegenüber  $^{123}\text{IdU}$  zuließ.

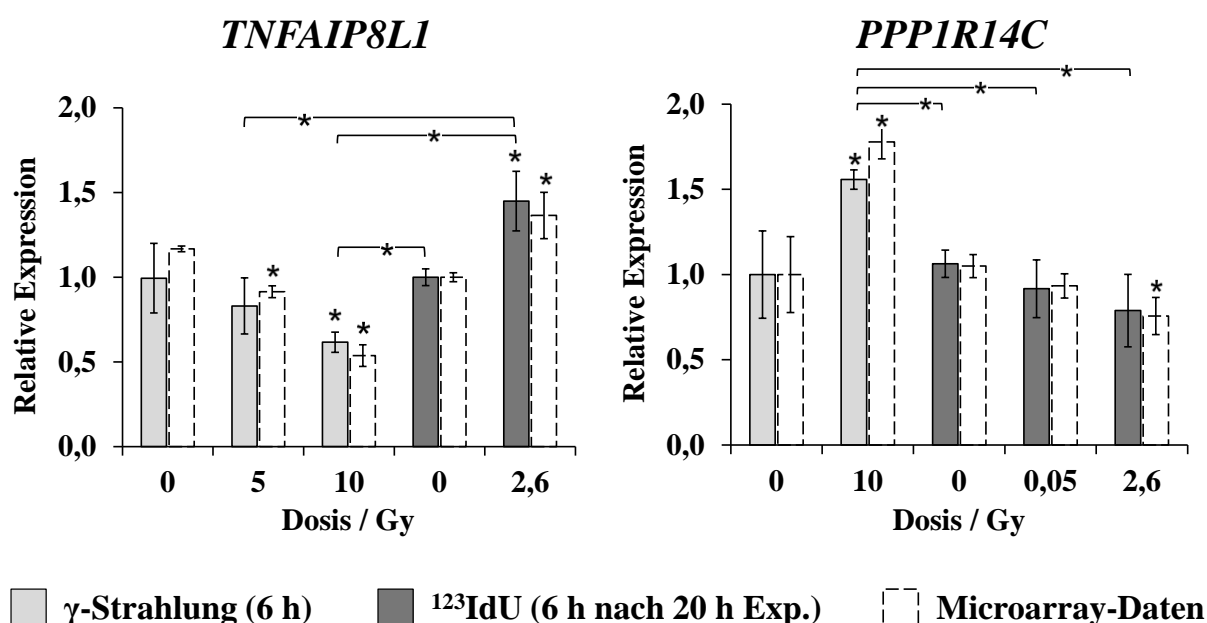
### $\gamma$ -Strahlung vs. $^{123}\text{IdU}$ :

Wie schon unter 3.7 erwähnt, wurde beim Vergleich  $\gamma$ -Bestrahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition die Genexpression sowohl 6 h als auch 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit der Genexpression 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition verglichen.

Die qRT-PCR-Untersuchungen zeigten, dass das Gen *TNFAIP8L1* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,45-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war, während es 6 h nach 5 bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 1,2-fach bzw. signifikant 1,6-fach gegenüber der eigenen Kontrolle herunterreguliert war (Abb. 29).

Der direkte Genexpressionsunterschied zwischen der 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und der 5 bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung war 1,75-fach bzw. 2,35-fach und in beiden Fällen signifikant. Die unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten waren hinsichtlich ihrer Genexpression nahezu identisch. Bezogen auf die einzelnen Datenpunkte war die *TNFAIP8L1*-Genexpression bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen sehr ähnlich (Abb. 29). In beiden Fällen war *TNFAIP8L1* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition signifikant hochreguliert, gleichzeitig war es 6 h nach 5 bzw. 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich

herunterreguliert, bezogen auf die qRT-PCR-Daten bzw. der Microarray-Daten nach 10 Gy bzw. nach 5 und 10 Gy sogar signifikant. Die Vielfache der Genexpressionen der Datenpunkte relativ zu der unbestrahlten  $^{123}\text{IdU}$  Kontrolle, zu der die anderen Datenpunkte ins Verhältnis gesetzt wurden, waren bei qRT-PCR bzw. Microarray sehr ähnlich (Abb. 29). Schließlich lässt sich erkennen, dass *TNFAIP8L1* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\alpha$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ. Auffällig ist, dass das Gen *TNFAIP8L1* sowohl nach  $\gamma$ -Bestrahlung (Abb. 29) als auch nach  $\alpha$ -Bestrahlung (Abb. 28) herunterreguliert, während es nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition hochreguliert war.



**Abb. 29: Relative Expression von *TNFAIP8L1* und *PPP1R14C* 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 6 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung.**

Die grau gefüllten Balken mit durchgezogener Linie bilden die Daten der qRT-PCR ab. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen. \*p < 0,05; wenn sich \* allein über einem Datenbalken befindet, dann ist die Signifikanz gegenüber der eigenen Kontrolle gekennzeichnet. Bezüglich der qRT-PCR-Daten wurden auch noch andere Signifikanzen mit Klammern gekennzeichnet.

Die Daten der qRT-PCR zeigten, dass das Gen *PPP1R14C* 6 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 1,56-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war, während es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,16-fach bzw. 1,35-fach gegenüber der eigenen Kontrolle herunterreguliert war (Abb. 29). Des Weiteren war der direkte Genexpressionsunterschied zwischen der 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung und der 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,7-fach bzw. 2-fach und in beiden Fällen signifikant (Abb. 29). Die Genexpression der unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten war nahezu identisch. Die *PPP1R14C*-Genexpression der einzelnen Datenpunkte der qRT-PCR verglichen mit denen der Microarray-Analysen war sehr ähnlich (Abb. 29). In beiden Untersuchungen war

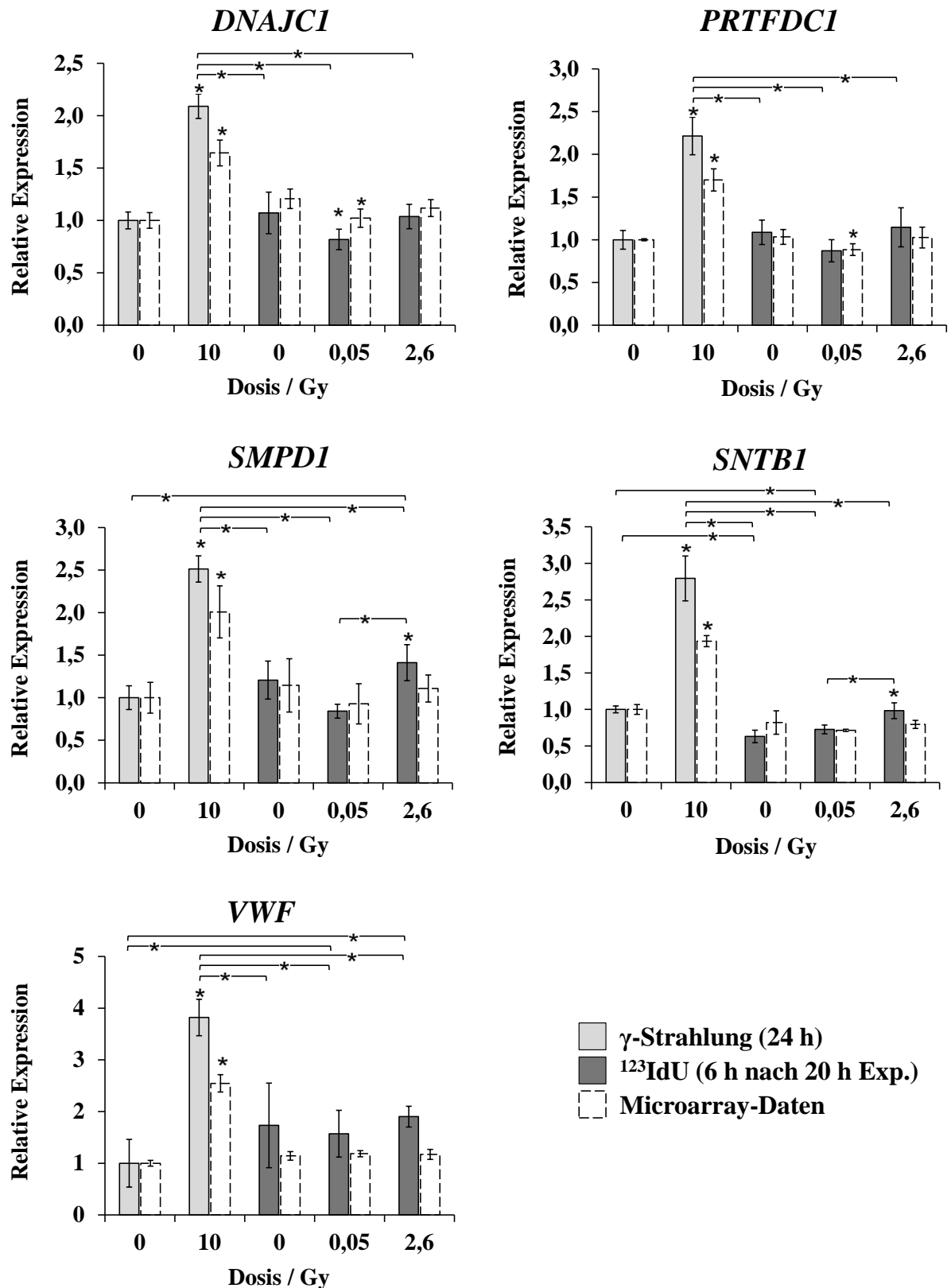
*PPP1R14C* 6 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich signifikant hochreguliert, während es 6 h nach 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition herunterreguliert war, bezogen auf die Microarray-Daten nach 2,6 Gy sogar signifikant. Auch die Vielfache der Genexpressionen der Datenpunkte relativ zu der unbestrahlten Kontrolle, zu der die anderen Datenpunkte ins Verhältnis gesetzt wurden, waren bei qRT-PCR bzw. Microarray sehr ähnlich (Abb. 29). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass *PPP1R14C* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ.

Nachfolgend werden die Genexpressionen von *DNAJC1*, *PRTFDC1*, *SMPD1*, *SNTB1* und *VWF* 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit denen 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition verglichen. Die qRT-PCR-Untersuchungen dokumentierten, dass das Gen *DNAJC1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 2,1-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war, während es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,3-fach signifikant herunterreguliert bzw. nicht reguliert war (Abb. 30). Die *DNAJC1*-Genexpression war in Bezug auf die einzelnen Datenpunkte bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen ähnlich (Abb. 30). In beiden Fällen war *DNAJC1* 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition deutlich und signifikant hochreguliert. Währenddessen war es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gering aber signifikant herunterreguliert bzw. nicht reguliert. Zudem zeigten die qRT-PCR-Analysen, dass der direkte *DNAJC1*-Genexpressionsunterschied zwischen der 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und der 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 2,55-fach bzw. 2-fach und in beiden Fällen signifikant war (Abb. 30).

Die Genexpression der unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten waren nahezu identisch. Insgesamt lässt sich feststellen, dass *DNAJC1* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ.

Die qRT-PCR-Untersuchungen veranschaulichten, dass das Gen *PRTFDC1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 2,2-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war, derweil war es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition 1,25-fach herunterreguliert bzw. nicht reguliert (Abb. 30). Der direkte *PRTFDC1*-Genexpressionsunterschied zwischen der 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und der 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung war 2,55-fach bzw. 2-fach und in beiden Fällen signifikant (Abb. 30).

Die unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten waren hinsichtlich ihrer Genexpression nahezu identisch. Bezogen auf die einzelnen Datenpunkte war die *PRTFDC1*-Genexpression bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen ähnlich (Abb. 30).



**Abb. 30: Relative Expression von *DNAJC1*, *PRTFDC1*, *SMPD1*, *SNTB1* und *VWF* 6 h nach 20-stündiger <sup>123</sup>IdU-Exposition bzw. 24 h nach γ-Bestrahlung.**

Die grau gefüllten Balken mit durchgezogener Linie bilden die Daten der qRT-PCR ab. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen. \*p < 0,05; wenn sich \* allein über einem Datenbalken befindet, dann ist die Signifikanz gegenüber der eigenen Kontrolle gekennzeichnet. Bezüglich der qRT-PCR-Daten wurden auch noch andere Signifikanzen mit Klammern gekennzeichnet.

Beide Methoden zeigten, dass *PRTFDC1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich und signifikant hochreguliert war, während es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gering herunterreguliert bzw. nicht reguliert war. Schließlich lässt sich feststellen, dass *PRTFDC1* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ.

Die *SMPD1*-Genexpression war bezogen auf die einzelnen Datenpunkte bei den qRT-PCR- und Microarray-Untersuchungen weitgehend ähnlich (Abb. 30). In beiden Fällen war *SMPD1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich und signifikant hochreguliert, simultan war es 6 h nach 20-stündiger 0,05 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gering herunterreguliert. Durch geringe Expressionsunterschiede nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zeigte die qRT-PCR eine geringe aber signifikante Hochregulation gegenüber der eigenen Kontrolle, während die Microarray-Analyse eine Nichtregulation von *SMPD1* verzeichnete. Da die qRT-PCR-Daten somit die gleiche Regulationsrichtung nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zeigten, war *SMPD1* eher nicht als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  geeignet.

Bezogen auf die einzelnen Datenpunkte war die *SNTB1*-Genexpression bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen annähernd ähnlich (Abb. 30). In beiden Untersuchungen war *SNTB1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung deutlich und signifikant hochreguliert. Die Microarray-Analyse zeigte 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition eine geringe Herunter- bzw. Nichtregulation von *SNTB1* gegenüber der eigenen Kontrolle, währenddessen dokumentierte die qRT-PCR nach 0,05 und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition eine geringe Hochregulation, für 2,6 Gy sogar signifikant. Demnach zeigten die qRT-PCR-Daten die gleiche Regulationsrichtung nach  $\gamma$ -Bestrahlung bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, weshalb *SNTB1* als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  problematisch war. Dagegen sprach auch, dass der Genexpressionsunterschied der unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten 1,6-fach und signifikant war (Abb. 30), welches eine Diskriminierung beider Strahlenqualitäten voneinander erschwerte.

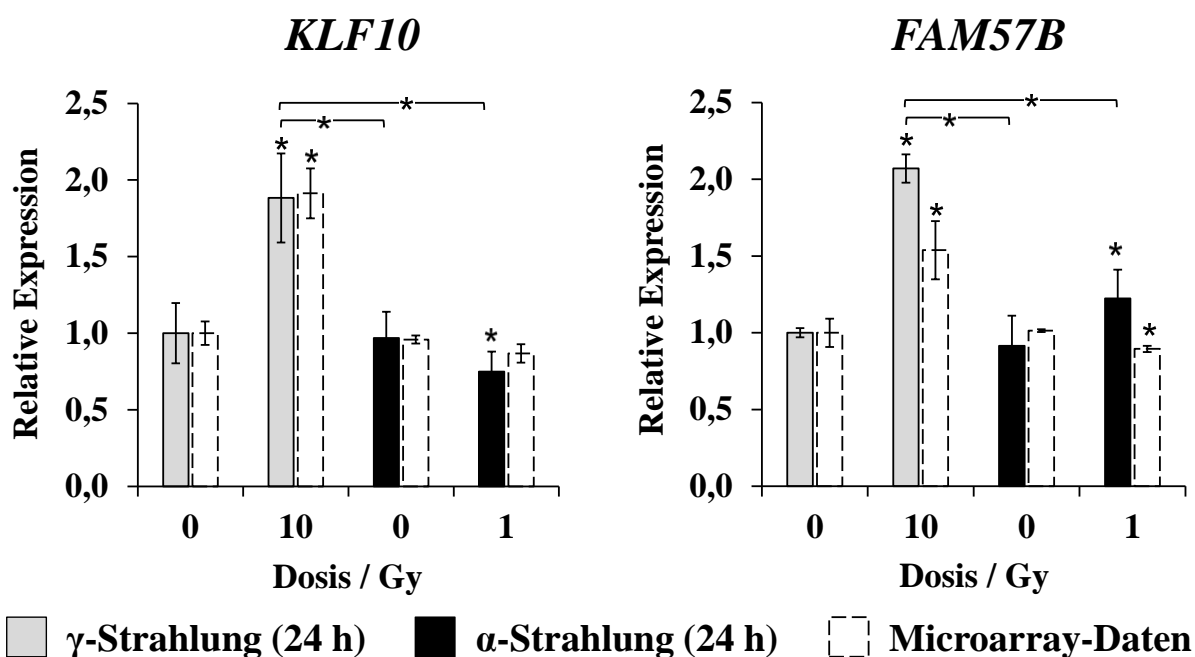
Die qRT-PCR-Untersuchungen zeigten, dass das Gen *VWF* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 4,83-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle hochreguliert war, unterdessen war es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition nicht reguliert (Abb. 30). Auch die Microarray-Daten zeigten, dass das Gen *VWF* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung hochreguliert war, während es 6 h nach 20-stündiger 0,05 bzw. 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition nicht reguliert war. Da jedoch die qRT-PCR-Daten zeigten, dass der *VWF*-Genexpressionsunterschied der unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten 1,73-fach war (Abb. 30) und dies eine



Diskriminierung beider Strahlenqualitäten voneinander problematisierte, lässt sich schlussfolgern, dass *VWF* als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  eher ungeeignet war.

### $\gamma$ -Strahlung vs. $\alpha$ -Strahlung:

Die Daten der qRT-PCR zeigten, dass *KLF10* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 1,88-fach gegenüber der eigenen Kontrolle signifikant hochreguliert war. Währenddessen war es 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung 1,29-fach signifikant gegenüber der eigenen Kontrolle herunterreguliert (Abb. 31). Der direkte Expressionsunterschied zwischen 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung war hierbei 2,51-fach und signifikant. Die unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten waren in ihrer Genexpression nahezu identisch.

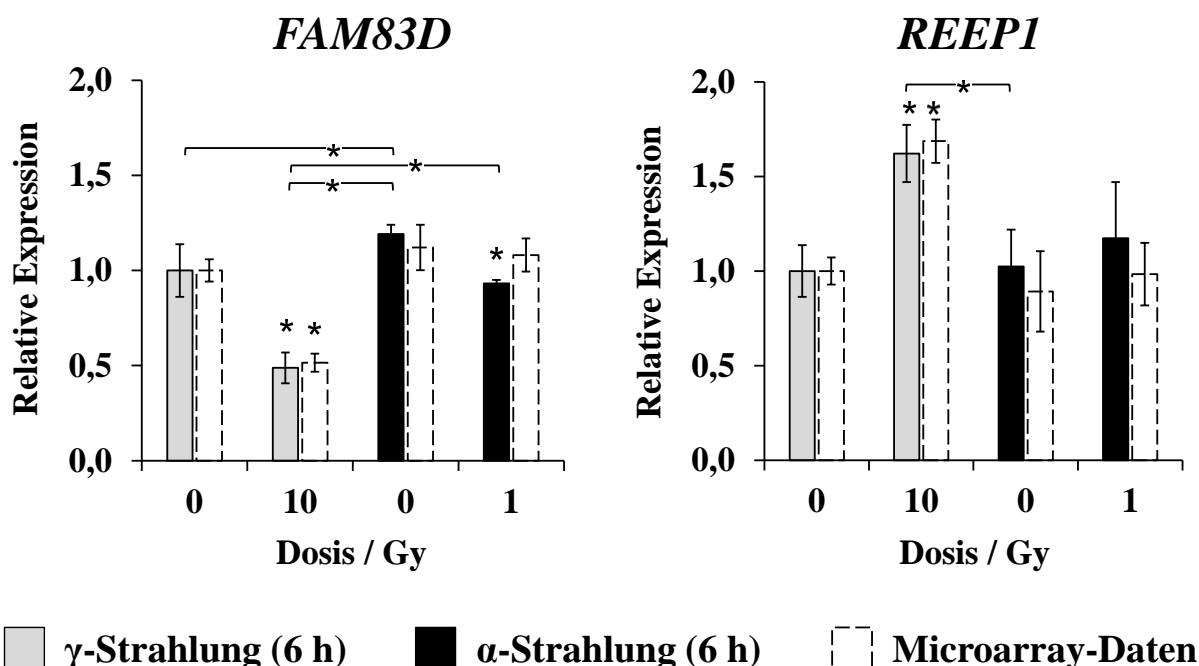


**Abb. 31: Relative Expression von *KLF10* und *FAM57B* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ - bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung.**

Die grau bzw. schwarz gefüllten Balken mit durchgezogener Linie bilden die Daten der qRT-PCR ab. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$ ; wenn sich \* allein über einem Datenbalken befindet, dann ist die Signifikanz gegenüber der eigenen Kontrolle gekennzeichnet. Bezüglich der qRT-PCR-Daten wurden auch noch andere Signifikanzen mit Klammern gekennzeichnet.

Die *KLF10*-Genexpression war bezogen auf die einzelnen Datenpunkte bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen sehr ähnlich (Abb. 31). In beiden Untersuchungen war *KLF10* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant hochreguliert, während es 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung herunterreguliert war, bezüglich der qRT-PCR-Daten sogar signifikant. Auch die Vielfache der Genexpressionen der Datenpunkte relativ zu der unbestrahlten Kontrolle, zu der die anderen Datenpunkte ins Verhältnis gesetzt wurden, waren bei qRT-PCR-bzw.

Microarray sehr ähnlich (Abb. 31). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *KLF10* ein Kandidatengen war, welches die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Strahlung zuließ.



**Abb. 32: Relative Expression von *FAM83D* und *REEP1* 6 h nach 10 Gy  $\gamma$ - bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung.**

Die grau bzw. schwarz gefüllten Balken mit durchgezogener Linie bilden die Daten der qRT-PCR ab. Die Standardabweichung resultiert aus drei unabhängigen Versuchen. \*p < 0,05; wenn sich \* allein über einem Datenbalken befindet, dann ist die Signifikanz gegenüber der eigenen Kontrolle gekennzeichnet. Bezüglich der qRT-PCR-Daten wurden auch noch andere Signifikanzen mit Klammern gekennzeichnet.

Beim Vergleich der *FAM57B*-Genexpression zwischen qRT-PCR und Microarray zeigte sich, dass in beiden Untersuchungen *FAM57B* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant hochreguliert war (Abb. 31). Unterdessen zeigte die qRT-PCR eine signifikante Hochregulation während der Microarray eine Herunterregulation 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung zeigte. Da die qRT-PCR-Daten somit die gleichen Regulationsrichtungen nach  $\gamma$ -Bestrahlung bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung zeigten, war *FAM57B* eher nicht als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ - vs.  $\alpha$ -Strahlung geeignet.

Die *FAM83D*-Genexpression war in Bezug auf die einzelnen Datenpunkte bei den qRT-PCR- und Microarray-Analysen eher ähnlich (Abb. 32). Hierbei zeigte sich, dass *FAM83D* 6 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung in beiden Untersuchungen signifikant herunterreguliert war.

Während die qRT-PCR nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung eine signifikante geringe Herunterregulation gegenüber der eigenen Kontrolle zeigte, war *FAM83D* bei der Microarray-Analyse nicht reguliert. Daher war *FAM83D* als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Bestrahlung eher ungeeignet war, da die qRT-PCR-Daten nach 10 Gy

$\gamma$ -Bestrahlung bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung die gleichen Regulationsrichtungen zeigten. Zudem war der Genexpressionsunterschied der unbestrahlten Kontrollen beider Strahlenqualitäten signifikant (Abb. 32), welches eine Diskriminierung beider Strahlenqualitäten voneinander erschwerte.

Bezogen auf die einzelnen Datenpunkte war die *REEP1*-Genexpression bei den qRT-PCR- und Microarray-Untersuchungen weitgehend ähnlich (Abb. 32). Beim Vergleich der *REEP1*-Genexpression zwischen qRT-PCR und Microarray zeigte sich, dass in beiden Untersuchungen *REEP1* 6 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant hochreguliert war. Während bei der qRT-PCR eine geringe Hochregulation nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung gemessen wurde, zeigte die Microarray-Analyse eine Nichtregulation von *REEP1*. Demnach war *REEP1* als Kandidatengen für die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Bestrahlung eher problematisch, da die qRT-PCR-Daten die gleiche Regulationsrichtung nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung zeigte.

#### Zusammenfassung der Kandidatengene, die auf Basis der qRT-PCR-Daten die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben:

Beim Vergleich der Genexpressionen 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und 6 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung wurde *TNFAIP8L1* als Kandidatengen identifiziert, welches die Diskriminierung von  $\gamma$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition als auch  $\alpha$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zuließ.

Zudem wurden beim Vergleich der Genexpressionen 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und 6 h bzw. 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung die Gene *PPP1R14C* bzw. *DNAJC1* und *PRTFDC1* als Kandidatengene identifiziert, die die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zuließen. Des Weiteren wurde beim Vergleich der Genexpressionen 24 h nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung das Gen *KLF10* als Kandidatengen identifiziert, das die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Strahlung zuließ.

## 4. Diskussion

### 4.1 Dosimetrierelevante Ergebnisse in Bezug auf die $^{123}\text{IdU}$ -Exposition

#### 4.1.1 DNA-*Uptake* von $^{123}\text{IdU}$

Die DNA-Extraktionsanalyse zeigte, dass im Mittel 88% bzw. 69% der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität, die in Jurkat-Zellen nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling gemessen wurde, in der DNA lokalisiert war. Das stand im Einklang mit den Ergebnissen von Reske *et al.* [184], die die humane Leukämiezelllinie HL60 für 24 h bzw. 2 h mit 5- $^{123}\text{I}$ -thio-2'-deoxyuridine ( $^{123}\text{ITdU}$ ) inkubierten und 83,3% bzw. 46,3% der von den Zellen aufgenommenen  $^{123}\text{ITdU}$ -Aktivität in der DNA inkorporiert vorfanden. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der von Reske *et al.* [184] war die Effizienz des DNA-*Uptake* nach kürzerer Exposition mit dem AEE auch geringer. Morgenroth *et al.* [144] labelten die humanen Myelomzelllinien KMS12BM bzw. U266 für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen  $^{125}\text{IdU}$  und zeigten, dass 60% bzw. ca. 90% der von den Zellen aufgenommenen  $^{125}\text{IdU}$ -Aktivität in der DNA inkorporiert war. Dabei waren die akkumulierten  $^{125}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle der eingesetzten Zellen als auch die der zellulären extrahierten DNA annähernd proportional zu der eingesetzten  $^{125}\text{IdU}$ -Aktivitätskonzentrationen, welches auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Mit Hilfe der DNA-*Uptake* Versuche wurde gezeigt, dass der Großteil der im Zellpellet gemessenen  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität in der DNA lokalisiert war. Daher wurde der Zellkern und nicht die ganze Zelle als relevante Masse für die  $^{123}\text{IdU}$ -Dosimetrie betrachtet, welches eine genauere Dosimetrie ermöglicht, da die biologischen Wirkungen von AEE abhängig von der intrazellulären Verteilung der Nuklide sind [85, 179].

#### 4.1.2 Volumenbestimmung der Zelle und des Zellkerns bei Jurkat-Zellen

Die Bestimmung des Zell- bzw. Zellkernvolumens war unerlässlich für die Kalkulation der absorbierten Energiedosis nach Exposition mit DNA-assoziierten AEE und somit auch für die Vergleichbarkeit mit anderen Strahlenqualitäten [85, 104, 133]. Durch 3-D Vermessungen mittels konfokaler Mikroskopie wurde bei Jurkat-Zellen der Durchmesser des Zellkerns bzw. der Zelle mit  $10,8 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{m}$  bzw.  $13,9 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{m}$  bestimmt. In Bezug auf den Zellkerndurchmesser stimmte dies mit den Ergebnissen von Cremer *et al.* [46] überein, die einen Jurkat-Zellkerndurchmesser von  $10,9 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{m}$  mittels 3-D Vermessung (konfokale Mikroskopie) bestimmten. Bezüglich des Zelldurchmessers standen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in relativ guten Einklang mit den 2-D Vermessungen von Rosenbluth *et*

*al.* [192], Deng *et al.* [55], Tozeren *et al.* [226] bzw. Wheeler *et al.* [244], die einen Jurkat-Zelldurchmesser von  $11,5 \pm 1,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $13,5 \pm 6,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $15 \pm 2 \text{ }\mu\text{m}$  bzw. ca.  $15 \text{ }\mu\text{m}$  angaben. Rosenbluth *et al.* [192] gaben an, dass der Zellkerndurchmesser ca.  $55 \pm 8\%$  des Zelldurchmessers betrug. In der vorliegenden Arbeit betrug der Zellkerndurchmesser ca.  $77 \pm 5\%$  des Zelldurchmessers. Da davon auszugehen war, dass weder die Zellen noch die Zellkerne perfekte Kugelformen waren, konnten Abweichungen von diesen eher durch die hier verwendete 3-D Vermessung (siehe 2.2.6.5) kompensiert werden als von den oben zitierten 2-D Vermessungen. Zudem war die hier verwendete 3-D Vermessung vermutlich genauer als die oben genannten 2-D Vermessungen, bei denen je Zelle nur in einer optischen Fokusebene gemessen wurde, da bei der 3-D Vermessung mehrere optische Schnitte pro Zelle und somit viel mehr Messpunkte pro Zelle analysiert wurden.

Zudem korrelierten die Zellvolumina mit den zugehörigen Zellkernvolumina, und das Volumen des größten Zellkerns war doppelt so groß wie das des kleinsten Zellkerns, was offensichtlich darin begründet liegt, dass der DNA-Gehalt von G2/M-Zellen doppelt so groß wie der von G1-Zellen ist. So wurde bereits gezeigt, dass kleinere Zellen eher G1-Zellen und größere Zellen eher S- und G2/M-Zellen sind [195].

#### **4.1.3 Zelluläre Uptake-Rate und interzelluläre Verteilung von $^{123}\text{IdU}$**

Durch die sehr kurze Reichweite von niederenergetischen AE ist die biologische Wirkung auf eine Zelle vor allem davon abhängig, ob diese den AEE überhaupt aufgenommen hat. Daher war es wichtig den Anteil von  $^{123}\text{IdU}$ -gelabelten Zellen zu bestimmen, welches mittels Co-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}/\text{EdU}$  durchgeführt wurde. Hierbei wurde festgestellt, dass EdU keinen Einfluss auf die  $^{123}\text{IdU}$ -Aufnahme hatte. Dem konform konnte auch Akudugu *et al.* [1], die die humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 für 3 h mit  $^{125}\text{IdU}$  sowie EdU co-labelten, feststellen, dass  $^{125}\text{IdU}$  und EdU nicht-kompetitiv in die DNA eingebaut wurden, so dass durch diese Methode  $^{125}\text{IdU}$ -gelabelte Zellen zuverlässig identifiziert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass am Ende der 20-stündigen Exposition durchschnittlich 94% der Zellen EdU und somit auch  $^{123}\text{IdU}$  inkorporiert hatten, welches u. a. auch für andere biologische Endpunkte dieser Arbeit die Vermutung zuließ, dass die beobachteten biologischen Effekte nahezu von allen Zellen bewirkt wurden. Zudem war die hohe Einbaurate ein weiteres Indiz für eine effektive Synchronisation der Jurkat-Zellen.

Akudugu *et al.* [1] verzeichneten nach 3-stündiger  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition einen Anteil von 10% bzw. 15% an  $^{125}\text{IdU}$ -gelabelten Zellen bei MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen. Dem ähnlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Anteil von 26% an  $^{123}\text{IdU}$ -gelabelten Zellen nach 5-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gemessen.

Seitdem bekannt ist, dass in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung ein G2/M-Zellzyklusarrest induziert werden kann [28, 57], konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass 417 akkumulierte  $^{123}\text{I}$ -Zerfälle pro Zelle während der 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ausreichend waren, um einen massiven G2/M-Zellzyklusarrest in Jurkat-Zellen zu induzieren. Dem ähnlich erwähnten Olive & Banath [156] einen partiellen G2/M-Zellzyklusarrest in V79-Hamsterlungenfibroblasten ab 160 Zerfällen pro Zelle während der 24-stündigen Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$ . Auch Makrigiorgos *et al.* [133] beobachteten in V79-Zellen nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, dass sich Zellen ab 1,5 mBq pro Zelle nach 18-stündiger Exposition nicht mehr teilten, welches dem Zellzyklusarrest in der vorliegenden Arbeit, der nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bei 1,2-4 mBq pro Zelle induziert wurde, sehr nahe kam.

### 4.2. Mikrokerninduktion 24 h nach ionisierender Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass für alle drei Strahlenqualitäten 24 h nach Exposition die Anzahl an Mikrokernen dosisabhängig anstieg. Allerdings galt das nicht für die  $\gamma$ -Bestrahlung ab 5 Gy, obwohl die DSB-Induktion, gemessen mittels Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Intensität, bis 20 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung dosisabhängig anstieg (siehe 3.3.2). Es konnte in verschiedenen Zellsystemen für Niedrig-LET Bestrahlung bereits gezeigt werden, dass die Mikrokernrate ab 5 Gy nicht mehr dosisabhängig anstieg [103, 146, 235], da bei diesen hohen Dosen eine Selektion gegen stark geschädigte Zellen stattfindet, die sich somit nicht mehr mitotisch teilen konnten, welches aber bei dem hier verwendeten Mikrokern-Assay notwendig ist [65]. Dass Jurkat-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung einen G2/M-Zellzyklusarrest induzierten und in der Folge mitotisch inaktiv waren, wurde bereits in anderen Studien publiziert [28, 57].

Die Mikrokerninduktion 24 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition nahm bis zu einer Dosis von ca. 0,4 Gy stark zu und lief danach bei höher werdender Dosis in eine Sättigung, welches auch bereits bei der Quantifizierung der DSB mittels  $\gamma$ -H2AX beobachtet wurde (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Eine Erklärung hierfür wäre die Induktion eines G2/M-Zellzyklusarrest ab einer bestimmten Anzahl an akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfällen pro Zelle, wie bereits unter 3.1.3 gezeigt wurde. In der Folge würden nur dann binukleäre Zellen gebildet werden, wenn die akkumulierten Zerfälle pro Zelle unterhalb dieses Grenzwertes liegen, so dass letztendlich die Mikrokerninduktion bei Zunahme der akkumulierten Zerfälle pro Zelle in eine Sättigung läuft. Ein weiterer Erklärung für die Sättigung der Mikrokerninduktion ist, dass während der 20-stündigen Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  die Apoptose- und Nekroseinduktion vermehrt in Zellen mit einer höheren Anzahl an totalen akkumulierten  $^{123}\text{I}$ -Zerfällen induziert wurde, was bereits von Yasui [251] in humanen MCF-7 Brustkrebszellen nach Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$  beobachtet

wurde. Diese hochbestrahlten apoptotischen und nekrotischen Zellen können nicht mehr vom Mikrokern-Assay repräsentiert werden.

Die Mikrokerninduktion war 24 h nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ - bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bei gleichen Strahlendosen bis zu einer Dosis von 1 Gy ähnlich, so dass die Mikrokernbildung in Jurkat-Zellen bis zu einer Dosis von 1 Gy als unabhängig von der Strahlenqualität betrachtet werden konnte. Dem gegensätzlich wurde beobachtet, dass die Mikrokerninduktion in humanen Lymphozyten 72 h nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich mit Röntgen- bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung RBE-Werte von 3,6 bzw. 2-3,2 zeigte [18, 231]. Auch in Ratten-Alveolarepithelzellen konnte 15 h nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich zu Röntgenbestrahlung ein RBE-Wert von 4,3 gefunden werden [248]. Ein Grund für die erhöhten RBE-Werte nach Hoch-LET gegenüber Niedrig-LET Bestrahlung könnte die langsamere bzw. unvollständigere DSB-Reparatur nach Hoch-LET Bestrahlung sein, was bereits in verschiedenen Studien gezeigt wurde [188, 215, 221]. Dem gegensätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Mikrokerninduktion nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich mit  $\gamma$ -Bestrahlung gefunden werden, obwohl der  $\gamma$ -H2AX Assay eine stark erhöhte  $\gamma$ -H2AX Signalintensität bzw. wesentlich größere und/oder signalstärkere  $\gamma$ -H2AX Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung zeigte als nach  $\gamma$ -Bestrahlung, was als ein Hinweis auf einen stärkeren bzw. komplexeren DNA-Schaden nach  $\alpha$ -Bestrahlung gedeutet werden könnte [90]. Dass Jurkat-Zellen DSB-reparaturunfähig sein könnten und so ein nicht erhöhter RBE-Wert bezüglich Mikrokerninduktion nach Hoch-LET bzw. Niedrig-LET Bestrahlung erklärbar wäre, wie es Groesser *et al.* [73] in DSB-reparaturunfähigen xrs6-Zellen zeigten, konnte ausgeschlossen werden, da Jurkat-Zellen 60 min nach 50 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung ca. 64% der DSB reparierten [62]. Auch Courdi *et al.* [44] zeigten in humanen Melanomzellen 48 h nach 0,25-3 Gy Bestrahlung mit Argon-Ionen gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung nur einen RBE-Wert von 1,2-0,5 bezüglich der Mikrokernbildung. Sie vermuteten, dass die Inkubationszeit von 48 h nicht ausreichen könnte, um eine adäquate Analyse von binukleären Zellen durchzuführen, da nach Hoch-LET Bestrahlung ein längerer Zellzyklusarrest die Mitose verzögerte [41, 130, 204]. Auch in der vorliegenden Arbeit könnte ein längerer Zellzyklusarrest die Mitose sowie die Ausbildung binukleärer Zellen stärker in  $\alpha$ -bestrahlten Zellen verzögert haben als in  $\gamma$ -bestrahlten Zellen, so dass es nach  $\alpha$ -Bestrahlung zu keiner erhöhten Mikrokerninduktion kam. Demgemäß beobachteten Vandenbulcke *et al.* [231] in humanen Lymphozyten nur 10% binukleäre Zellen nach  $\alpha$ -Bestrahlung während nach  $\gamma$ -Bestrahlung 30-50% der Zellen binukleär waren.

Darüber hinaus wurde im gleichen Zeitraum wie die Mikrokernanalyse eine stärkere Apoptoseinduktion nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich mit  $\gamma$ -Bestrahlung gefunden (siehe 3.4),

welches einer potentiellen Erhöhung der Mikrokerninduktion nach  $\alpha$ -Bestrahlung entgegenwirkte.

Obwohl im  $\gamma$ -H2AX Assay bei gleichen Dosen eine stark erhöhte DSB-Induktion nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung nachgewiesen wurde und komplexe DNA-Läsionen nach Exposition mit DNA-assoziierten AEE mittels Monte-Carlo-Simulationen bereits gezeigt wurden [173], konnte in dieser Arbeit keine erhöhte Mikrokerninduktion nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition im Vergleich mit  $\gamma$ -Bestrahlung gefunden werden. Dass hierfür unterschiedliche DNA-Reparaturkinetiken nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und  $\gamma$ -Bestrahlung verantwortlich sein könnten, bleibt spekulativ, da nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber Röntgenbestrahlung sowohl eine ineffektivere und langsamere DNA-Reparatur in V79-Hamsterlungenfibroblasten [159] als auch eine ähnliche DNA-Reparaturkinetik in Chinesischen Hamster-Ovarienzellen [92] nachgewiesen wurde.

Für die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse könnte ein Dosisrateneffekt eine Erklärung sein. Im Gegensatz zu Painter *et al.* [159] und Iliakis *et al.* [92], die nach dem  $^{125}\text{IdU}$ -Labeling die Zellen für die Dosisakkumulation einfroren, akkumulierten die Jurkat-Zellen, in denen 24 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition die Mikrokerninduktion bestimmt wurde, ihre gesamte Dosis über mehrere Stunden, während die Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung ihre Dosis in einem sehr kurzen Zeitraum erhielten. Durch diese niedrigere Dosisrate nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition war mehr Zeit vorhanden, um mehr DNA-Reparatur zu ermöglichen als im Studiendesign von Painter *et al.* [159] und Iliakis *et al.* [92], so dass möglicherweise weniger Mikrokerne gebildet wurden.

Zudem konnten in humanen Zellen weniger Mikrokerne bzw. Chromosomenaberrationen nach Niedrig-LET Bestrahlung mit einer niedrigeren Dosisrate als mit einer höheren Dosisrate gezeigt werden, was auch auf eine vermehrte DNA-Reparatur während der Bestrahlung mit der niedrigeren Dosisrate zurückgeführt wurde [84, 150, 234]. Kriehuber *et al.* [118] verhinderten nach Exposition mit dem AEE  $^{65}\text{Zn}$  im Prinzip einen Dosisrateneffekt mittels Einfrieren und konnten in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCLII bzw. der Amnionfibroblasten-ähnlichen Zelllinie AFFL nach Exposition mit  $^{65}\text{Zn}$  gegenüber Röntgenbestrahlung RBE-Werte von 2 bzw. 4 bezüglich Mikrokerninduktion zeigen. Die hohe Radiotoxizität von  $^{65}\text{Zn}$  wurde der Akkumulation dieses AEE in der perinukleären Region der Zelle zugeschrieben, so dass ein großer Anteil der Energiedeposition in der Nähe des Zellkerns stattfand.

Dass die im  $\gamma$ -H2AX Assay gefundene stark erhöhte DSB-Induktion nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung (siehe 3.3.1 und 3.3.2) zu keiner erhöhten Mikrokerninduktion



fürhte, könnte auch daran liegen, dass bei der  $\gamma$ -Bestrahlung nicht-synchronisierte Zellen eher in der G1- und weniger in der S- und G2/M-Phase bestrahlt wurden, während die synchronisierten Zellen, die  $^{123}\text{IdU}$  inkorporierten eher in der S-Phase und durch den Zellzyklusarrest (siehe 3.1.3) auch vermehrt in der G2/M-Phase bestrahlt wurden. Frühere Studien verzeichneten bereits eine erhöhte Strahlenresistenz in S [93] und eine erhöhte DNA-Reparatur in G2 [245].

### 4.3 $\gamma$ -H2AX Analyse

#### 4.3.1 Charakterisierung und Quantifizierung von $\gamma$ -H2AX Foci mittels Mikroskopie

Die räumliche Verteilung der  $\gamma$ -H2AX Foci nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{123}\text{IdU}$  war eher homogen, welches mit den Beobachtungen von Yasui [251] nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{125}\text{IdU}$  in humanen MCF-7 Brustkrebszellen übereinstimmte. Währenddessen zeigte die mikroskopische Charakterisierung häufig ein streifenförmiges *Clustering* der Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung als Ergebnis einzelner  $\alpha$ -Partikel-Durchgänge durch den Zellkern. Auch Desai *et al.* [56] beobachteten in humanen Vorhautfibroblasten ein streifenförmiges *Clustering* der Foci nach Bestrahlung mit Eisen- bzw. Silizium-Ionen.

Die Beobachtung mittels Mikroskopie zeigte, dass die durch  $\alpha$ -Partikel induzierten Foci durchschnittlich wesentlich größer und/oder signalstärker waren als Foci, die nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{123}\text{IdU}$  induziert wurden. Das steht im Einklang mit den Untersuchungen von Costes *et al.* [43] in humanen Vorhautfibroblasten nach Bestrahlung mit Stickstoff-Ionen mit einem LET von 130 keV/ $\mu\text{m}$ , welcher mit dem LET der  $\alpha$ -Partikel in dieser Arbeit vergleichbar ist. Costes *et al.* [43] zeigten nach 3D hochauflösender Bildanalyse, dass sowohl die Größe als auch die Intensität der  $\gamma$ -H2AX Foci nach Bestrahlung mit Stickstoff-Ionen über einen Zeitraum von 2 h 2-fach anstieg, während keine signifikanten Änderungen nach Röntgenbestrahlung detektiert wurden. Auch Ibanez *et al.* [90] stellten im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung einen starken Anstieg der  $\gamma$ -H2AX Foci-Größe in Mausmelanomzellen nach Exposition mit Lithium-Ionen fest. Sie vermuteten, dass im Vergleich zur Niedrig-LET Photonenstrahlung der Anstieg der Foci-Größe nach Hoch-LET Bestrahlung auf deren Induktion vermehrt gehäufte bzw. komplexere DNA-Läsionen zurückzuführen sei, wie es auch vielfach in der Literatur beschrieben wurde [24, 99, 158, 177].

Die mikroskopische Quantifizierung dokumentierte, dass die mittlere Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung bei gleichen Strahlendosen sehr ähnlich war und damit einem RBE-Wert von ca. 1 entsprach, welches konform mit den Daten von Franken *et al.* [67] war, die  $\gamma$ -H2AX Foci in humanen Lungenkarzinom-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung und

$\alpha$ -Bestrahlung detektierten. Dem konträr waren die Ergebnissen von Leatherbarrow *et al.* [122], welche V79-Hamsterlungenfibroblasten vertikal zu einem  $\alpha$ -Partikelstrahl exponierten. Leatherbarrow *et al.* [122] detektierten nur 3,8 Foci/Zelle/Gy nach  $\alpha$ -Bestrahlung aber 10,4 Foci/Zelle/Gy nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Aufgrund der vertikal ausgerichteten  $\alpha$ -Bestrahlung könnten Leatherbarrow *et al.* (2006) die Anzahl der Foci stark unterschätzt haben, da sie die Projektion der Foci induzierenden  $\alpha$ -Partikel Tracks in ihrer adhärent wachsenden Zellkultur analysierten. Deswegen war in der vorliegenden Arbeit von Vorteil, dass die Jurkat-Suspensionszellen ihre räumliche Orientierung zwischen  $\alpha$ -Bestrahlung und finaler Auswertung änderten und dadurch eine bessere Auflösung der Foci entlang des Tracks für viele Zellen erlaubten. Nichtsdestotrotz würde man bei gleicher Dosis eine höhere Anzahl von Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung erwarten. Die Anzahl der Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung wurde aufgrund von Überlappungseffekten und der Trackorientierung in der vorliegenden Arbeit sehr wahrscheinlich noch immer unterschätzt. Auch Desai *et al.* [56] konstatierten, dass die Anzahl der Foci pro Track nach paralleler Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen nicht akkurat bestimmt werden konnte und nicht mit der Anzahl an erwarteten DSB übereinstimmte.

Einzelne durch  $^{123}\text{IdU}$  induzierte  $\gamma$ -H2AX Foci ähnelten in ihrer Größe und Signalintensität eher den durch  $\gamma$ -Bestrahlung induzierten als den durch  $\alpha$ -Bestrahlung induzierten Foci. Auch Yasui [251] beobachtete in humanen MCF-7 Brustkrebszellen, dass sich die  $\gamma$ -H2AX Foci in ihrer Größe und Signalintensität nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlen und  $^{125}\text{IdU}$  ähnelten. Da vermutet wurde, dass die sehr komplexe DNA-Schädigung nach Hoch-LET Bestrahlung den starken Anstieg der  $\gamma$ -H2AX Foci-Größe gegenüber Niedrig-LET Bestrahlung bewirkte [90], lässt sich schlussfolgern, dass die angenommene Komplexität der DNA-Läsionen, wie sie für DNA-assoziierte AEE beschrieben wurde [173], sich nicht in Foci-Größe und -Intensität nach Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  widerspiegelte.

Um eine geeignete Vergleichbarkeit zwischen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition mit  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung bezüglich der Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci herzustellen, wurde das Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  ausgewählt. Damit handelte es sich bei allen Strahlenqualitäten um Kurzzeitexpositionen. Die mikroskopische Quantifizierung veranschaulichte, dass bei gleichen Dosen die mittlere Foci-Anzahl pro Zelle nach Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  einen 13-mal höheren Anstieg zeigte im Vergleich zur  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung, welches einem RBE-Wert von 13 entsprach. Obwohl nicht jeder  $^{123}\text{I}$ -Zerfall innerhalb der DNA zu einem DSB führt [171, 173] kann dieser hohe RBE-Wert vermutlich u. a. dadurch erklärt werden, dass 69% der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität, die in Jurkat-Zellen nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling gemessen wurde, in der DNA lokalisiert war (siehe

3.1.1). Somit konnte  $^{123}\text{IdU}$  effizient DSB induzieren, da fast alle Ionisationsereignisse in unmittelbarer Nähe der DNA stattfanden im Gegensatz zur  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung, bei denen Ionisationsereignisse auch in anderen Zellkompartimenten vorkommen. Für DSB, die mittels neutraler Filterelution bestimmt wurden, wurden nach Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$  relativ zu  $\gamma$ -Bestrahlung RBE-Werte von 2,9 bzw. 2,3 in Chinesischen Hamster-Ovarienzellen (CHO) bzw. humanen MCF-7 Brustkrebszellen dokumentiert [249, 250]. Yasui *et al.* [250] vermuteten, dass der angewendete Assay nicht alle DSB in komplexen DNA-Läsionen abbildete und so die niedrigen RBE-Werte verursachte, so dass vermutlich die DSB-Induktion unterschätzt wurde. Wenn allerdings die Dosimetrie von Yasui *et al.* [249] auf die Arbeit von Yasui [251] angewendet werden würde, welches plausibel erscheint, da in beiden Arbeiten ähnliche Expositionsbedingungen mit  $^{125}\text{IdU}$  in den identischen MCF-7 Zellen vorlagen, würde bezüglich der  $\gamma$ -H2AX Induktion bis zu einer Dosis von 1 Gy auch nur ein RBE-Wert von 1 nach  $^{125}\text{IdU}$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Rate von 0,16  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bestimmt. Wenn angenommen wird, dass ein Foci mindestens einem DSB entsprach, dann war diese Rate niedrig im Vergleich mit den computersimulierten Daten von Pomplun *et al.* [173], die eine Häufigkeit von ca. 0,46 DSB pro  $^{123}\text{I}$ -Zerfall kalkulierten. Dem ähneln auch die Daten von Makrigiorgos *et al.* [134], welche V79-Hamsterlungenfibroblasten mit  $^{123}\text{IdU}$  oder  $^{125}\text{IdU}$  für 18 h labelten, dann kryokonservierten und per neutraler Filterelution analysierten. Dabei kalkulierten sie eine Rate von 0,45-0,74 DSB pro  $^{123}\text{I}$ -Zerfall, allerdings unter der Annahme, dass ein  $^{125}\text{I}$ -Zerfall ein DSB induzierte, wie es Elmroth & Stenerlow [61] in Säugerzellen zeigten. Hingegen fand auch Yasui [251] mit nur 0,26  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall eine niedrige Rate in MCF-7 Zellen und sah damit keine 1:1:1 Korrelation zwischen  $^{125}\text{I}$ -Zerfall, DSB und  $\gamma$ -H2AX Foci. Sie vermutete, dass die Anzahl an  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall unterschätzt wurde, da, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die Zellen mit Hilfe des Radikalfängers DMSO eingefroren wurden und somit die Produktion und Diffusion von strahleninduzierten Radikalen sowie deren induzierten DNA-Schäden signifikant reduziert sein sollten. So konnten Sedelnikova *et al.* [205], die humane Astrozytomazellen mit  $^{125}\text{IdU}$  für 30 min labelten, 1 h später fixierten und demnach nicht mit DMSO kryokonservierten, eine Rate von 0,8  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall kalkulieren. Schließlich lässt sich bzgl. der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die in den Puls-Labeling-Experimenten bestimmte Rate von 0,16  $\gamma$ -H2AX Foci pro  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall aufgrund der DMSO-Behandlung unterschätzt wurde.

Die mittlere Foci-Anzahl pro Zelle nach 0,05; 0,1 bzw. 0,2 Gy Puls-Labeling mit  $^{123}\text{IdU}$  war vergleichbar mit der Foci-Anzahl nach der 3,2; 2,7- bzw. 4,6-fachen Dosis nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. Da die Zellen nach dem einstündigen Puls-Labeling kryokonserviert und damit bezogen auf biologische Prozesse inaktiviert wurden, haben die Zellen in einem sehr kurzen Zeitraum die gesamte Dosis erhalten. Im Gegensatz dazu erhielten die Zellen nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ihre gesamte Dosis innerhalb von mehreren Stunden, so dass währenddessen DNA-Reparaturprozesse stattfinden konnten und somit sich die Foci-Rate gegenüber den puls-gelabelten Zellen verringerte, was den Daten von Sedelnikova *et al.* [205] entspricht. Sedelnikova *et al.* [205] synchronisierten und labelten humane Astrozytomazellen mit  $^{125}\text{IdU}$  für 20 h bzw. für 30 min in der frühen S-Phase. Auch sie vermuteten, dass DNA-Reparatur während der 20-stündigen Exposition dafür verantwortlich war, dass die Foci-Anzahl pro  $^{125}\text{I}$ -Zerfall nach Puls-Labeling im Vergleich zur 20-stündigen Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$  von 0,8 auf 0,24 sank.

Die Frage, ob jeder  $\gamma$ -H2AX Focus einen DSB abbildet, wird kontrovers diskutiert [193]. So wurde bereits gezeigt, dass einzelne  $\gamma$ -H2AX Foci nach  $\gamma$ -Bestrahlung in Zellen persistieren nachdem die DSB repariert waren [135], was aber kein Nachteil in der vorliegenden Arbeit war, da der  $\gamma$ -H2AX Assay hier dazu diente die DSB-Induktion, nicht aber die DSB-Reparatur, zu untersuchen.

Sowohl die mittlere Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle (siehe 3.3.1) als auch die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität (siehe 3.3.2) nach 20-stündiger Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  stieg nicht-linear mit steigender Dosis an und schien bei höher werdender Dosis in eine Sättigung zu laufen, welches bezüglich der Foci-Anzahl pro Zelle im Einklang mit den Untersuchungen von Yasui [251] nach Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$  in humanen MCF-7 Brustkrebszellen steht. Eine Erklärung hierfür wäre die Apoptose- und Nekroseinduktion während der 20-stündigen Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$ , welches bereits bei der Mikrokerninduktion diskutiert wurde (siehe 4.2). Bei der Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Foci mittels Mikroskopie können in apoptotischen und nekrotischen Zellen keine Foci bestimmt werden. Bei der durchflusszytometrischen Quantifizierung wurden sowohl Debris als auch Sub-G1-Zellen, unter denen häufig apoptotische Zellen zu finden sind [153], ebenfalls ausgeschlossen (siehe 2.2.8.3). Demzufolge lief bei höher werdender Dosis und zunehmender Anzahl an Debris und apoptotischen/ nekrotischen Zellen die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität und Anzahl von  $\gamma$ -H2AX Foci nach 20-stündiger Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  in eine Sättigung.

#### 4.3.2 Quantifizierung der $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach Exposition mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Quantifizierung zeigte, dass bei gleichen Strahlendosen die relative mittlere Intensität der  $\gamma$ -H2AX Signale pro Zelle nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung ca. 10-fach signifikant erhöht war. Die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung war nahezu identisch. Dies kann durch wesentlich größere und/oder signalstärkere Foci nach  $\alpha$ -Bestrahlung erklärt werden, was sehr gut im Einklang mit den mikroskopischen Beobachtungen der  $\gamma$ -H2AX Foci steht (siehe 3.3.1). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität pro Zelle, nicht aber die mittlere Anzahl an  $\gamma$ -H2AX Foci pro Zelle, vom LET abhängig ist. Eine weitere Schlussfolgerung für die Auswertung von  $\gamma$ -H2AX Foci ist, dass die Durchflusszytometrie geeigneter zu sein scheint als die mikroskopische Auswertung per Auge, da erstere die LET-Abhängigkeit von Foci-Größe und -Intensität berücksichtigt. Zudem wird bei der Durchflusszytometrie das Problem der Mikroskopie bezüglich Überlappungseffekte und Trackorientierungsprobleme der Foci vermieden. Darüber hinaus ist die durchflusszytometrische Quantifizierung durch die hohen Zellzahlmessungen statistisch wesentlich stärker als die mikroskopische Quantifizierung.

In der Literatur wurden kleinere RBE-Werte in Bezug auf die durchflusszytometrische Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach Hoch- bzw. Niedrig-LET Bestrahlung gefunden. Dementsprechend bestimmten Whalen *et al.* [243] und Chappell *et al.* [30] in humanen 82-6 hTert Fibroblasten 0,5 h bzw. 2 h nach Exposition mit Eisen-Ionen im Vergleich zu Röntgenbestrahlung RBE-Werte von 1,8 bzw. 2,1. Nach Bestimmung der DSB-Induktion mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurden RBE-Werte zwischen 1 bis 3,5 nach  $\alpha$ -Bestrahlung gegenüber Röntgenbestrahlung kalkuliert [38, 39, 152].

Der Anstieg der mittleren  $\gamma$ -H2AX Signalintensität pro Zelle nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling war im Vergleich zur  $\alpha$ -Bestrahlung nahezu identisch aber im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung ca. 8-fach höher. Da die  $\gamma$ -H2AX Foci nach  $^{123}\text{IdU}$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition sehr ähnlich bezüglich ihrer Intensität und Größe waren (siehe 3.3.1), erklärt sich die erhöhte mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling gegenüber der  $\gamma$ -Bestrahlung durch die höhere Foci-Anzahl nach dem  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling. Die RBE-Werte für DSB nach Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$ , die mittels Induktion von  $\gamma$ -H2AX Foci bzw. neutraler Filterelution untersucht und bereits unter 4.3.1 diskutiert wurden, waren mit 1-2,9 relativ gering ausgeprägt gegenüber dem RBE-Wert von ca. 8, der in dieser Arbeit für die  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bestimmt wurde. Allerdings wurden nach Untersuchung des

Zellüberlebens in V79-Hamsterlungenfibroblasten ähnlich hohe RBE-Werte von ca. 7 bzw. 9 nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition [133] und  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition [104] bzw. nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition [85] gefunden. In einer der Studien konnten Howell *et al.* [85] zeigen, dass DNA-inkorporiertes  $^{125}\text{IdU}$  genauso wirksam war wie 5,3 MeV  $\alpha$ -Partikel, welches dem entspricht, was in der vorliegenden Arbeit nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling und  $\alpha$ -Bestrahlung (3,35 MeV in der Zelle) bzgl. der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität gefunden wurde.

### 4.3.3 Quantifizierung und Verteilung der zellulären $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz mittels innovativer Durchflusszytometrieanalyse

Die unter 3.3.3 beschriebene Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* veranschaulichte eindrucksvoll, dass die Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale abhängig von der Strahlenqualität war. So zeigte sich, dass diese Verteilung nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln bzw.  $^{123}\text{IdU}$  im Gegensatz zur  $\gamma$ -Bestrahlung wesentlich breiter und heterogener war. Auch Whalen *et al.* [243] beschrieben in 82-6 hTert Fibroblasten eine breitere Verteilung der  $\gamma$ -H2AX Signale nach Exposition mit Eisen-Ionen gegenüber Röntgenbestrahlung, welches zusätzlich mittels mathematischer Auswertung quantifiziert und bestätigt werden konnte [30].

Die breitere Verteilung der  $\gamma$ -H2AX Signale nach  $\alpha$ -Bestrahlung bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Pulse-Labeling im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung kam durch das Vorhandensein von einerseits vermehrt fluoreszenzschwachen  $\gamma$ -H2AX negativen Zellen zustande, die nicht von  $\alpha$ -Partikeln getroffen wurden bzw. die kein  $^{123}\text{IdU}$  eingebaut hatten und andererseits von vermehrt extrem signalstarken  $\gamma$ -H2AX positiven Zellen, die von mehreren  $\alpha$ -Partikeln getroffen wurden bzw. die viel  $^{123}\text{IdU}$  eingebaut hatten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die biologischen Effekte nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln bzw.  $^{123}\text{IdU}$  wahrscheinlich eher von relativ wenigen aber extrem exponierten Zellen kamen im Gegensatz zur  $\gamma$ -Bestrahlung. Diese strahlenqualitätsspezifische Variabilität der  $\gamma$ -H2AX Signalintensitäten mit vermehrt fluoreszenzstärkeren sowie fluoreszenzschwächeren Zellen nach Exposition mit  $\alpha$ -Partikeln bzw.  $^{123}\text{IdU}$  zeigte sich auch am Beispiel, bei dem die durchflusszytometrischen Messung identische Median-Werte der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, 0,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung bzw. 0,7 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling zeigte.

Dass die innovative Durchflusszytometrieanalyse die strahlenqualitätsspezifische Variabilität der  $\gamma$ -H2AX Signalintensitäten einzelner Zellen abbildete, ist somit ein Vorteil gegenüber der einfachen durchflusszytometrischen Messung bei der pro Messpunkt nur ein Mittelwert der Signalintensitäten einzelner Zellen berechnet wurde.

Ein weiterer Vorteil der innovativen Durchflusszytometrieanalyse zeigte sich dadurch, dass die berechneten Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von  $\alpha$ -Partikeltreffern pro Zellkern von der Verteilung der  $\gamma$ -H2AX Signale durch diese Analyse abgebildet werden konnten. Die Poisson-Verteilung der Partikeltreffer pro Zellkern ist wichtig für das Verständnis der biologischen Effekte von Hoch-LET Strahlung [56]. Besonders bei geringen Dosen wird nur eine kleine Fraktion an Zellen getroffen, so dass die biologischen Effekte eher von der zellulären Trefferrate abhängt als von der makroskopischen Dosis wie beispielsweise bei  $\gamma$ -Bestrahlung [151].

Mittels der innovativen Durchflusszytometrieanalyse wurde nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung beobachtet, dass die Zunahme der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität in bestrahlten G1-Zellen viel stärker war als in bestrahlten S- und G2/M-Zellen, welches auch bereits in anderen Arbeiten dokumentiert wurde [107, 132, 243] und das obwohl es gemäß Poisson-Verteilung in G2- und S-Zellen mehr DSB als in G1-Zellen geben müsste, da in diesen der DNA-Gehalt höher ist. So wurden in einigen Arbeiten doppelt so viel  $\gamma$ -H2AX Foci in G2- als in G1-Zellen [17, 54, 126] ermittelt. Whalen et al., 2008 vermuteten, dass nach DNA-Schädigung entweder S- und G2/M-Zellen geringere Mengen an  $\gamma$ -H2AX induzierten oder dass die Reparatur in diesen Zellzyklusphasen schneller und/oder effektiver ablief als in G1-Zellen. Dementsprechend wurde bereits eine erhöhte DNA-Reparatur in G2-Zellen [245] und eine erhöhte Strahlenresistenz in S-Zellen [93] gezeigt. Der stärkere Anstieg der  $\gamma$ -H2AX Intensität in bestrahlten G1-Zellen gegenüber bestrahlten S- und G2/M-Zellen wäre allerdings auch durch größere und/oder signalstärkere  $\gamma$ -H2AX Foci in bestrahlten G1-Zellen erklärbar.

Die innovative Durchflusszytometrieanalyse zeigte nach  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling eine stark vermehrte Akkumulation von sehr signalstarken  $\gamma$ -H2AX positiven Zellen in der S-Phase gegenüber der G1- und G2/M-Phase, welches ursächlich darin begründet liegt, dass das Thymidinanalogon  $^{123}\text{IdU}$  nur in der S-Phase inkorporiert wurde. Nach dem einstündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling wurde die DNA-Synthese mittels Kryokonservierung gestoppt, so dass die DNA-Schäden und somit auch die  $\gamma$ -H2AX Signale v. a. in der S-Phase akkumulierten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Durchflusszytometrieanalyse mit den stufenweise angeordneten *Gates* eine hilfreiche Bereicherung zu der Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX Signalintensität durch Medianwerte ist, da diese Analyse nicht nur die Variabilität der  $\gamma$ -H2AX Signalintensitäten einzelner Zellen sondern auch eine zellzyklusspezifische Auswertung ermöglicht.

#### 4.4 Apoptoseinduktion 24 h nach ionisierender Bestrahlung

Die durch die ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden können in lymphoblastoiden Zelllinien zum Zellzyklusarrest, zur Aktivierung der DNA-Reparatur und bei einer zu starken Schädigung zur Induktion der Apoptose führen [98, 129]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass bei gleichen Dosen die Apoptoseinduktion nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung ca. 5-mal effizienter war. Dass  $\alpha$ -Partikel effizienter Apoptose induzieren als  $\gamma$ -Strahlen wurde bereits mehrfach gezeigt. Palayoor *et al.* [160] bzw. Vandenbulcke *et al.* [231] beobachteten 24 h nach  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich zur  $\gamma$ -Bestrahlung RBE-Werte von ca. 4 bzw. 2 in humanen Leukämiezellen. Eine Ursache für diesen erhöhten RBE-Wert gegenüber Niedrig-LET Bestrahlung könnte die langsamere bzw. unvollständigere DSB-Reparatur nach Hoch-LET Bestrahlung sein [188, 215, 221], welches auf vermehrt gehäufte bzw. komplexere DNA-Läsionen nach Hoch-LET Bestrahlung zurückzuführen ist [24, 99, 102, 158, 177]. Eine Ursache für die effizientere Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen nach  $\alpha$ -Bestrahlung könnte darin begründet liegen, dass die Apoptoseantwort nach  $\alpha$ -Bestrahlung schneller war als die nach  $\gamma$ -Bestrahlung, wie es Meijer *et al.* [137] in Lymphozyten nach Bestrahlung mit Stickstoff-Ionen gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung zeigen konnten. Sie dokumentierten bezüglich der Apoptoseinduktion 24 h bzw. 48 h nach Exposition RBE-Werte von 2 bzw. 2,4. Erwähnenswert ist auch die Schlussfolgerung von Mori *et al.* [145], dass Hoch-LET, nicht aber Niedrig-LET Bestrahlung P53-unabhängig Apoptose induzieren kann. Da Jurkat-Zellen P53-defizient sind [31, 128], wäre das eine weitere Erklärung, warum Hoch-LET  $\alpha$ -Bestrahlung effizienter Apoptose induzierte als Niedrig-LET  $\gamma$ -Bestrahlung.

Die Apoptoseinduktion nach  $\gamma$ - und  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition war bei gleichen Dosen nahezu identisch, obwohl die im  $\gamma$ -H2AX Assay gesehene DSB-Induktion bei gleichen Dosen nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition im Vergleich mit  $\gamma$ -Bestrahlung stark erhöht war. Das könnte auf einen Dosisrateneffekt zurückzuführen sein. Die  $\gamma$ -bestrahlten Zellen wurden mit einer sehr hohen Dosisrate von 0,7 Gy/min bestrahlt, wogegen die  $^{123}\text{IdU}$ -exponierten Zellen über mehrere Stunden ihre Dosis akkumulierten. Durch die niedrigere Dosisrate nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition war somit mehr Zeit vorhanden, um DNA-Reparatur zu ermöglichen, so dass möglicherweise weniger Zellen apoptotisch wurden. Bei der Apoptoseinduktion scheint die Dosisrate wesentlich zu sein. So zeigte bereits Amundson *et al.* [4] mit Abnahme der Dosisrate eine Abnahme der Apoptoseinduktion in humanen ML1-Lymphomzellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Kriehuber *et al.* [118] umgingen einen Dosisrateneffekt mittels Kryokonservierung und konnten nach Exposition mit dem AEE  $^{65}\text{Zn}$  in der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCLII



bzw. der Amnionfibroblasten-ähnliche Zelllinie AFFL gegenüber Röntgenbestrahlung RBE-Werte von 8,5 bzw. 5,8 bezüglich Apoptoseinduktion zeigen. Die hohe Radiotoxizität von  $^{65}\text{Zn}$  wurde dabei der Akkumulation dieses AEE in der perinukleären Region der Zelle zugeschrieben. Da die RBE-Werte bezüglich Apoptoseinduktion nach  $^{65}\text{Zn}$ -Exposition im Vergleich mit Röntgenbestrahlung sehr hoch waren, vermuteten Kriehuber *et al.* [118], dass die  $^{65}\text{Zn}$ -Akkumulation und folglich dessen hohe Energiedeposition in der perinukleären Region Apoptose womöglich auch ohne DNA-Schädigung induzierte. Dem konform konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise über den Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Weg Apoptose induziert werden konnte, ohne die DNA zu schädigen [77]. Denn beim Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Apoptoseweg, bei dem der Auslöser die strahleninduzierte Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid an der Zellmembran ist, erfolgte demnach der apoptotische Stimulus an der Zellmembran und nicht im Zellkern [77].

In Jurkat-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass der Ceramid-vermittelte Sphingomyelin-Weg bei der Apoptoseinduktion nach  $\alpha$ - sowie  $\gamma$ -Bestrahlung eine Rolle spielt [6, 206]. Das könnte für eine Erklärung hilfreich sein, warum in dieser Arbeit eine viel massivere DSB-Induktion nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung keine massivere Apoptoseinduktion zur Folge hatte. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 88% der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität, die in Jurkat-Zellen nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gemessen wurde, in der DNA lokalisiert war (siehe 3.1.1). So lässt sich vermuten, dass das in der DNA lokalisierte  $^{123}\text{IdU}$  weniger effizient als  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung den Ceramid-vermittelten Apoptoseweg in Jurkat-Zellen induzieren könnte, da die emittierten niederenergetischen AE, mit ihrer extrem kurzen Reichweite, kaum Bereiche in der Nähe der Zellmembran ionisierten, wie es jedoch für die Ceramid-vermittelte Apoptose notwendig wäre.

#### 4.5 Untersuchung des Ploidiegrades in Jurkat-Zellen

Um auszuschließen, dass in leukämischen Jurkat-Zellen eine mögliche Veränderung des Karyotyps nach vermehrter Zellteilung die Genexpressionsergebnisse nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten beeinflusste, wurde die Chromosomenanzahl pro Zelle in Abhängigkeit von der Zellpassage bestimmt. Hierbei wurde gezeigt, dass der Großteil der Jurkat-Zellen in allen Zellpassagen einen hypotetraploiden Karyotyp zeigten und dass bei den Zellpassagen P5, P8, P18 bzw. P26 die meisten Zellen in Bereichen von 84-90, 84-91, 84-92 bzw. 84-90 Chromosomen pro Zelle zu finden waren. Das steht im sehr guten Einklang mit den Angaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), von denen die Jurkat-Zelllinie bezogen wurde. Dementsprechend gibt die DSMZ an, dass Jurkat-Zellen einen hypotetraploiden Karyotyp und zwischen 78-91 Chromosomen pro Zelle

besitzen [60]. Die Mittelwerte/Modalwerte der Chromosomenanzahl pro Zelle lag für die Zellpassagen P5, P8, P18 bzw. P26 bei 86/86, 87/86, 87/90 bzw. 86/86, welches mit den Daten der DSMZ, die im Mittel 87 Chromosomen pro Jurkat-Zelle angaben, sehr gut übereinstimmt.

Sowohl die Mittelwerte/Modalwerte als auch die Schwankungsbereiche der Chromosomenanzahl pro Zelle, waren bei allen Zellpassagen sehr ähnlich, so dass zu schlussfolgern ist, dass die Jurkat-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, genomisch weitgehend als stabil zu betrachten sind. Vergleichbares berichteten Cremer *et al.* [46], die Jurkat-Zellen als genomisch stabil bezeichneten und wenige Chromosomenaberrationen fanden. Außerdem wurde festgestellt, dass Jurkat-Zellen ein geringes basales Level von Mikrokernen zeigten [45]. Aufgrund des Nachweises der relativen genomischen Stabilität von Jurkat-Zellen ist davon auszugehen, dass die Anzahl an Genkopien in den Zellen über viele Zellpassagen hinweg nahezu konstant blieb, so dass ein Einfluss auf die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsuntersuchungen nach Exposition nahezu ausgeschlossen werden konnte.

### **4.6 Genexpressionsuntersuchung nach Exposition mittels Microarrays**

#### **4.6.1 Äqui-Effektdosen für Microarray-Versuche**

Das Prinzip der Äqui-Effektdosen wurde bereits unter 1.2.1.2 und 1.4 erklärt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionen in humanen Lungenfibroblasten nach  $^{125}\text{IdU}$ - und  $\gamma$ -Exposition zu erreichen, wurde dieses Prinzip auch von Sokolov *et al.* [209, 210] angewendet, die Äqui-Effektdosen mit Hilfe der  $\gamma$ -H2AX Foci-Bildung bestimmten. Auch Meador *et al.* [136] bzw. Ding *et al.* [58] nutzten Äqui-Effektdosen bezüglich dem klonogenem Zellüberleben in lymphoblastoiden TK6-Zellen bzw. in humanen Bronchialepithelzellen nach Eisen-Ion- und  $\gamma$ -Bestrahlung bzw. Eisen-Ion-, Silizium-Ion- und  $\gamma$ -Bestrahlung.

#### **4.6.2 Veränderung der Genexpression nach Strahlenexposition**

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen in Jurkat-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten wurden die generierten Microarrays zunächst dahingehend ausgewertet, Gene zu identifizieren, die nach Hochdosisbestrahlung signifikante Veränderungen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle aufwiesen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass zu späten Zeitpunkten (24 h) nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung mehr Gene bzgl. ihrer Expression signifikant verändert waren, als dies kurz nach Exposition (6 h) der Fall war. Gleiches konnte auch in lymphoblastoiden Zellen bzw. Lymphozyten nach

$\gamma$ -Bestrahlung [2, 114] und in humanen Lungenepithelzellen nach  $\alpha$ -Bestrahlung [35] beobachtet werden.

Allerdings wurden bereits 6 h nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition viel mehr signifikant regulierte Gene gefunden als 6 h nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung. Das war vermutlich auf die 20-stündige  $^{123}\text{IdU}$ -Expositionszeit zurückzuführen. Beispielsweise waren bereits nach 5 h während der 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bereits ca. 26% der Zellen mit  $^{123}\text{IdU}$  gelabelt (siehe 3.1.3) und ca. 23% der  $^{123}\text{I}$ -Gesamtaktivität waren zerfallen, welches vermutlich bis zum Zeitpunkt der RNA-isolation, die 21 h später stattfand, bereits zu Genexpressionsveränderungen in diesen Zellen führte.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ca. 3,8-mal weniger Gene signifikant verändert waren als 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl bei diesen Dosen die DSB-Induktion, gemessen mittels  $\gamma$ -H2AX Assay (siehe 3.3.2), ähnlich war. Dem ähnlich wurden humane Lungenfibroblasten sowohl mit hoher als auch mit niedriger Dosisrate 1 Gy  $\gamma$ -bestrahlt bzw. mit  $^{125}\text{IdU}$  exponiert, so dass die Anzahl an  $\gamma$ -H2AX Foci nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition in etwa der entsprach wie nach 1 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung mit hoher Dosisrate [210]. Mit diesen Dosen wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition ca. 11-mal weniger Gene signifikant verändert waren als nach 1 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, welches gut mit den Daten in der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Interessanterweise zeigten Sokolov *et al.* [210], dass die Genexpressionsveränderung nach 1 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung sowohl mit hoher als auch mit niedriger Dosisrate gleich stark erhöht war, so dass ein Dosisrateneffekt eher nicht für die unterschiedliche Genexpressionsveränderung nach  $\gamma$ -Bestrahlung und  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition verantwortlich zu sein schien. Daraus schlussfolgerten Sokolov *et al.* [210], dass, wenn strahleninduzierte Schäden wie nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition nahezu ausschließlich im Zellkern induziert werden, dies eher einen geringen Effekt auf die globale Genexpression hat, da  $^{125}\text{IdU}$  eher keine zytoplasmatischen Signalwege induziert, die normalerweise durch homogene nicht nur auf den Zellkern gerichtete ionisierende Bestrahlung induzierbar sind [79, 139, 223]. Dies könnte auch eine Ursache sein, dass in der vorliegenden Arbeit nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition generell weniger Gene signifikant verändert waren als nach  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl die DSB-Induktion ähnlich war.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 13% bzw. 47% der signifikant veränderten Gene nach  $\gamma$ - bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gemeinsam reguliert waren. Ähnliche Verhältnisse in Bezug auf die prozentualen Anteile der gemeinsam regulierten Gene konnten auch Sokolov *et*

*al.* [210] zeigen. In deren Studie waren von den signifikant veränderten Genen nach  $\gamma$ - bzw. <sup>125</sup>IdU-Exposition 9% bzw. 96% gemeinsam reguliert.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Auswertungen, dass 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung ca. 2,2-mal weniger Gene signifikant verändert waren als 24 h nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl bei diesen Dosen die DSB-Induktion, gemessen mittels  $\gamma$ -H2AX Assay (siehe 3.3.2), vergleichbar war. Kurpinski *et al.* [121] konnten Ähnliches in humanen mesenchymalen Stammzellen nachweisen. 24 h nach Bestrahlung mit 0,1 Gy Eisen-Ionen waren ca. 4,4-mal weniger Gene signifikant verändert als 24 h nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung. Gegensätzlich dazu beobachteten Danielsson *et al.* [51] in humanen Vorhautfibroblasten, dass 5 h nach 0,25 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung ca. 1,4-mal mehr Gene signifikant reguliert waren als 5 h nach der 12-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 19% bzw. 43% der signifikant veränderten Gene 24 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung gemeinsam reguliert waren. Hingegen zeigten Kurpinski *et al.* [121], dass von den signifikant veränderten Genen 5 h nach  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung 10% bzw. 14% gemeinsam reguliert waren.

### 4.6.3 Induzierte biologische Prozesse und Signalwege nach Strahlenexposition

Nachfolgend werden die biologischen Prozesse und Signalwege betrachtet, die in Jurkat-Zellen nach Exposition signifikant überrepräsentiert waren. Im Anhang sind die dazugehörigen Genlisten zu finden.

#### 4.6.3.1 Die Nukleosomenorganisation und der Systemische Lupus erythematoses Signalweg

Der Systemische Lupus erythematoses ist eine autoimmune Multiorganerkrankung [115], bei der B-Lymphozyten Antikörper gegen DNA und nukleäre Proteine bilden und somit Gewebeschäden induzieren [141]. Nukleosomen sind komplexe Strukturen aus DNA und Histonen, die der Kompaktierung der DNA dienen [155].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Nukleosomenorganisation bzw. der Systemische Lupus erythematoses Signalweg nach Exposition bei allen drei Strahlenqualitäten signifikant reguliert wurden. Die meisten der hierbei beteiligten signifikant veränderten Gene waren sowohl beim Systemische Lupus erythematoses Signalweg als auch bei der Nukleosomenorganisation gemeinsam reguliert. Von diesen beteiligten Genen waren 87-100% Histongene, wobei bezüglich Nukleosomenorganisation und Systemische Lupus erythematoses Signalweg 100%, 91-95% bzw. 74-77% der Histongene gemeinsam nach <sup>123</sup>IdU-Exposition,  $\gamma$ -Bestrahlung bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung reguliert waren. Markant war, dass nach

Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten 93-98% der signifikant veränderten Histongene herunterreguliert waren. Das stand im Einklang mit den Untersuchungen von Meador *et al.* [136], welche sowohl P53-profiziente als auch P53-defiziente lymphoblastoide Zellen mit  $\gamma$ -Strahlen bzw. Eisen-Ionen bestrahlten und dabei eine ubiquitäre Herunterregulation der Histongene beobachteten. Dem konform zeigten auch Sokolov *et al.* [211] in humanen Zahnfleischfibroblasten und fötalen Hautfibroblasten eine Herunterregulation von Histongen nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition.

Meador *et al.* [136] konnten in lymphoblastoiden Zelllinien nachweisen, dass 24 h nach Exposition mit 1,67 Gy Eisen-Ionen mehr Histongene reguliert waren als 24 h nach 2,5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung. Dem ähnlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung ca. 1,3-mal mehr Histongene signifikant herunterreguliert waren als nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl insgesamt nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung 2-mal mehr Gene signifikant reguliert waren als nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung. Demnach war  $\alpha$ -Bestrahlung ein sehr effizienter Induktor der Histongenregulation.

Die Herunterregulation von Histongen in Zellen nach Bestrahlung könnte darin begründet sein, dass nach Bestrahlung häufig ein Zellzyklusarrest induziert und folglich auch die DNA-Synthese in proliferierenden Zellen angehalten wird, weshalb keine neuen Histone für die Kompaktierung neu synthetisierter DNA benötigt werden [218, 256]. Da bereits ein längerer bzw. stärker induzierter Zellzyklusarrest nach Hoch-LET gegenüber Niedrig-LET Bestrahlung beobachtet wurde [41, 130, 204], wäre es plausibel, dass dies auch in Jurkat-Zellen dazu führte, dass nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung mehr Histongene herunterreguliert waren als nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Strahlung. Diesbezüglich wäre es auch möglich, dass ein kürzerer bzw. schwächer induzierter Zellzyklusarrest nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber 10 Gy  $\gamma$ - bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung dafür verantwortlich war, dass in der Folge ca. 2- bzw. 3-mal weniger Histongene nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition herunterreguliert waren.

### 4.6.3.2 Die Apoptoseregulation

Die durch die ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden können in lymphoblastoiden Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest, zu einer Aktivierung der DNA-Reparatur und bei zu großen Schäden zu einer Induktion der Apoptose führen [98, 129].

Bezüglich der Expression apoptoserelevanter Gene nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung konnte festgestellt werden, dass gemeinsam regulierte Gene auch die gleiche Regulationsrichtung hatten. Nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung waren sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Gene sowohl herunter- als auch hochreguliert (siehe Anhang). Demzufolge ist die Apoptoseregulation in Jurkat-Zellen nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung auf Genexpressionsebene sehr

komplex und bedarf weiterer Erforschung. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung nur ca. 2,6-mal weniger apoptoserelevante Gene reguliert waren als nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung. Zeitgleich wurde bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoserate gemessen, dass nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung nur ca. 1,5-mal weniger Apoptose induziert wurde als nach der 10-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung. Hierdurch wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Partikel sehr effizient sowohl Apoptose als auch die Expression apoptoserelevanter Gene induzierten, welches vermutlich auch auf die langsamere bzw. unvollständigere DSB-Reparatur nach Hoch-LET Bestrahlung zurückzuführen ist [188, 215, 221]. Erwähnenswert wäre auch die Aussage von Mori *et al.* [145], dass Hoch-LET, nicht aber Niedrig-LET Bestrahlung, Apoptose P53-unabhängig induzieren kann. Da Jurkat-Zellen P53-defizient sind [31, 128], wäre das möglicherweise eine Erklärung, warum  $\alpha$ -Partikel sehr effizient die Expression apoptoserelevanter Gene induzierten. Dass  $\alpha$ -Partikel sehr effizient die Expression apoptoserelevanter Gene induzieren, dokumentierten auch Danielsson *et al.* [51] in humanen Vorhautfibroblasten, die zeigten, dass nach 0,25 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung sogar ca. 2-mal mehr apoptoserelevante Gene signifikant reguliert waren als nach der 12-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ca. 9-mal weniger apoptoserelevante Gene reguliert waren als nach der 4-fachen Dosis  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl bei diesen Dosen die DSB-Induktion, gemessen mittels  $\gamma$ -H2AX Assay (siehe 3.3.2), ähnlich war. Zeitgleich ergab die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate bei diesen Dosen, dass ca. 2-mal weniger Apoptose  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition induziert wurde als nach  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl die DSB-Induktion bei diesen Dosen ähnlich war und nahezu alle Ionisationsereignisse nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition in der Nähe der DNA stattfanden (siehe 3.1.1). Somit hat  $^{123}\text{IdU}$  mäßig bzw. sehr wenig effizient Apoptose bzw. die Expression apoptoserelevanter Gene induziert. Dies könnte ursächlich daran liegen, dass durch die niedrigere Dosisrate nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition gegenüber  $\gamma$ -Bestrahlung länger DNA-Reparatur stattfinden konnte, so dass deshalb weniger Apoptose bzw. apoptoserelevante Gene nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition induziert werden würden. Dem ähnlich zeigten bereits Amundson *et al.* [4] eine Abnahme der Apoptoseinduktion mit Abnahme der Dosisrate in humanen ML1-Lymphomzellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung. Sokolov *et al.* [209] bestrahlten humane Lungenfibroblasten mit  $\gamma$ -Strahlung sowohl mit hoher als auch mit niedriger Dosisrate bzw. exponierten diese mit  $^{125}\text{IdU}$ . Ihre Genexpressionsanalyse zeigten, dass der biologische Prozess der Apoptose nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung, nicht aber nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition signifikant

überrepräsentiert war, dass aber die Dosisrate während der  $\gamma$ -Bestrahlung keinen Einfluss auf die Induktion apoptoserelevanter Gene hatte.

In Bezug auf Jurkat-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Apoptose über den Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Weg, bei dem der apoptotische Stimulus an der Zellmembran und nicht im Zellkern lokalisiert war [77], nach  $\gamma$ -Bestrahlung induziert werden konnte [6]. In der vorliegenden Arbeit könnte die Hochregulation von *SMPD1* (Sphingomyelinphosphodiesterase 1 alias Saure Sphingomyelinase (ASMase)) und *CASP5* (Caspase 5) in Jurkat-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung (siehe Anhang) ein Hinweis auf den Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Apoptoseweg sein, da bereits in Hepatozyten gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Sphingomyelinphosphodiesterase 1 und Caspase 5 relevant für den Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Apoptoseweg war [258]. Da 88% der  $^{123}\text{IdU}$ -Aktivität in der DNA lokalisiert war (siehe 3.1.1) und somit die strahleninduzierte Schäden durch die extrem kurzen Reichweiten der emittierten niederenergetischen AE nahezu ausschließlich im Zellkern stattfanden, lässt sich vermuten, dass der Ceramid-vermittelten Sphingomyelin-Apoptoseweg nicht nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition induziert wurde. Somit wäre dies eine plausible Erklärung, warum viel weniger apoptoserelevante Gene in Jurkat-Zellen nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition induziert wurden als nach  $\gamma$ -Bestrahlung.

In einer weiteren Studie konnte in Jurkat-Zellen gezeigt werden, dass  $\gamma$ -Strahlung JNK1 aktivierte und zeitlich verzögert Apoptose induzierte [36]. Hierbei wurde das Gen *c-Jun*, wie auch in der vorliegenden Arbeit nach  $\gamma$ - und  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition beobachtet, hochreguliert, was in der Folge zur Hochregulation von *TNF* führt und schließlich Apoptose induziert, wie dies bereits nach UVB-Bestrahlung in Keratinozyten gezeigt werden konnte [14].

Nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition war jedoch in der vorliegenden Arbeit *TNF* in Jurkat-Zellen herunterreguliert, welches aber durch die zeitgleiche Hochregulation von *JDP2* erklärbar wäre. Es konnte nämlich bereits dokumentiert werden, dass nach UV-Strahlung das Produkt von *JDP2* die Aktivität von c-Jun und somit auch Apoptose unterdrückte [169], welches auch die Herunterregulation von *TNF* sowie die wenig effiziente Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition erklären könnte.

### 4.6.3.3 Die positive Regulation der DNA-Reparatur

Die DNA-Reparatur ist eine typische Antwort auf induzierte DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung, beispielsweise in lymphoblastoiden Zelllinien [97]. Der biologische Prozess „positive Regulation der DNA-Reparatur“ beschreibt den Prozess der Aktivierung der DNA-Reparatur. Die Analyse der biologischen Prozesse ergab, dass die positive Regulation der DNA-Reparatur nur nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-

Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, signifikant reguliert war. Dem ähnlich zeigten Sokolov *et al.* [209], die humane Lungenfibroblasten mit  $^{125}\text{IdU}$  bzw. mit  $\gamma$ -Strahlung sowohl mit hoher als auch mit niedriger Dosisrate bestrahlten und dabei ebenfalls mit äqui-gentoxischen Dosen arbeiteten, dass nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit hoher Dosisrate der biologische Prozess der Basenexzisionsreparatur auf Genexpressionsebene signifikant überrepräsentiert war.

Meador *et al.* [136] konnten in lymphoblastoiden Zellen weder nach Exposition mit Eisen-Ionen noch nach  $\gamma$ -Bestrahlung eine signifikant regulierte DNA-Reparatur auf Genexpressionsebene dokumentieren. In einer Studie, bei der auch relativ wenig DNA-Reparaturgene in lymphoblastoiden Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung reguliert waren, wurde die Ursache hierfür darin vermutet, dass viele Proteine, die durch DNA-Reparaturgene codiert werden, post-transkriptionell reguliert werden bzw. dass bereits die basale Expression vieler DNA-Reparaturgene ausreiche, um adäquat auf strahlungsinduzierte Schäden reagieren zu können [187]. Dies könnte eine wichtige Ursache dafür sein, dass in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten der Prozess der DNA-Reparatur nicht bzw. mit nur wenigen Genen überrepräsentiert war. Eine weitere Ursache hierfür könnte darin liegen, dass Jurkat-Zellen P53-defizient sind [31, 128], P53 aber in P53-profizienten lymphoblastoiden Zellen einen großen Einfluss auf die DNA-Reparatur hat [97].

In Bezug auf die positive Regulation der DNA-Reparatur waren die Gene *RNF168* und *UBE2N* in Jurkat-Zellen 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung herunterreguliert (siehe Anhang). Nach DSB-Induktion durch ionisierende Bestrahlung kann *UBE2N* alias *UBC13* entweder mit *RNF168* oder mit *RNF8* einen Komplex bilden und die Ubiquitinierung von Histonen katalysieren, welches der Rekrutierung von 53BP1 bzw. *BRCA1* dient und somit beim nicht-homologen *Endjoining* bzw. bei der homologen Rekombination eine Rolle spielt [13]. Die Herunterregulation von *RNF168* und *UBE2N* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung wäre möglicherweise dadurch erklärbar, dass der Prozess der Aktivierung von *UBE2N* bzw. *RNF168* einer der ersten Ereignisse nach DNA-Schädigung ist. Somit war möglicherweise kurz nach DNA-Schädigung die Expression von *RNF168* und *UBE2N* hochreguliert. Jedoch 24 h später, als es keinen Bedarf mehr an den Proteinen *UBE2N* und *RNF168* gab, wäre die Herunterregulation der entsprechenden Gene eine logische Folge.

Die DNA-Reparaturgene *CEBPG* und *FAM175A* alias *Abraxas* waren 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung hochreguliert. Die Hochregulation von *Abraxas* wäre nachvollziehbar, da *Abraxas* nach DSB-Induktion durch ionisierende Bestrahlung *BRCA1* bindet und somit bei der homologen Rekombination der DSB-Reparatur eine Rolle spielt [236].



Das Genprodukt CEBPG reguliert als Transkriptionsfaktor das DNA-Reparaturgen *ERCC5*, welches an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt ist [147, 222]. Eine Verbindung der Genexpressionregulation von *CEBPG* mit IR wurde in der Literatur bisher nicht gefunden.

### 4.6.3.4 Die negative Zellzyklusregulation

Die durch die ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden können in lymphoblastoiden Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest führen, welches den Zellen die Zeit gibt, die DNA-Reparatur zu aktivieren [97]. Auch Jurkat-Zellen sind in der Lage nach  $\gamma$ -Bestrahlung [28, 57] bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition (siehe 3.1.3) einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Auf der Ebene der Genexpression konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nur nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ , die negative Zellzyklusregulation mit nur 9 Genen überrepräsentiert war. Sokolov *et al.* [209] exponierten humane Lungenfibroblasten mit  $\gamma$ -Strahlung hoher als auch niedriger Dosisrate bzw. mit  $^{125}\text{IdU}$  und arbeiteten dabei mit äqui-gentoxischen Dosen. Sie zeigten, dass nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit hoher Dosisrate der biologische Prozess der Zellzyklusregulation auf der Genexpressionsebene signifikant überrepräsentiert war. Auch Meador *et al.* [136] konnten in lymphoblastoiden Zellen nur nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlung, nicht aber mit Eisen-Ionen, eine signifikant regulierte Zellzyklusregulation auf Genexpressionsebene dokumentieren.

Die P-53-Defizienz von Jurkat-Zellen [31, 128] könnte auch hier ursächlich dafür verantwortlich sein, dass nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten der Prozess der Zellzyklusregulation nicht bzw. mit nur wenigen Genen überrepräsentiert war, da P53 in P53-profizienten lymphoblastoiden Zellen u. a. auch einen Einfluss auf den Zellzyklus hat [97]. Eine weitere wichtige Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass viele zellzyklusrelevante Proteine eher post-transkriptionell als auf der Ebene der Genexpression reguliert werden [187].

In Jurkat-Zellen waren in Bezug auf die negative Zellzyklusregulation die Gene *BUB1*, *CENPE* und *CENPF* (siehe Anhang) nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung herunterreguliert, welches im Einklang mit Untersuchungen in anderen lymphoblastoiden Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung ist [187]. BUB1, CENPE und CENPF sind Proteine, die mit dem Spindel-*Checkpoint* assoziiert sind und während der Mitose in einer definierten Reihenfolge am Kinetochor binden und solange das Fortschreiten in die Anaphase verhindern, bis alle Chromosomen korrekt an der Spindel ausgerichtet sind [59]. Dass die Gene dieser Proteine herunterreguliert waren, lässt

sich möglicherweise durch den beobachteten G2-Zellzyklusarrest in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung erklären [28, 57].

### 4.6.3.5 Steroidmetabolismus und -biosynthese

Die Geneexpressionsanalyse der biologischen Prozesse bzw. der Signalwege ergab, dass nur nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ , der Steroidmetabolismus bzw. die Steroidbiosynthese signifikant reguliert war. Der Zusammenhang zwischen Regulation des Steroidmetabolismus bzw. der Steroidbiosynthese und ionisierender Bestrahlung ist noch recht unklar. Antiinflammatorische Steroide können beispielsweise als Reaktion auf eine strahleninduzierte Entzündung synthetisiert werden [50]. So wurde gezeigt, dass das steroidmetabolismusrelevante Gen *CYP11B* in Keratinozyten nach UV-B Bestrahlung hochreguliert war [108], was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach  $\gamma$ -Bestrahlung gut übereinstimmt (siehe Anhang). Hingegen waren so gut wie alle anderen Gene, die den Signalweg der Steroidbiosynthese betrafen, nach  $\gamma$ -Bestrahlung herunterreguliert.

Cholesterin ist ein wichtiges Produkt der Steroidbiosynthese sowie ein Hauptbestandteil der Zellmembranen von Säugetieren und wichtig für die Lebensfähigkeit und Zellproliferation [48]. Möglicherweise wurde die Steroidbiosynthese in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung herunterreguliert, weil weniger Cholesterin für Zellmembranen benötigt wurde, da Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung im Zellzyklus arretiert waren und kein Zellwachstum und keine Zellteilung stattfand [28, 57].

### 4.6.3.6 Die Antigenprozessierung und -präsentation

Ein Teil der adaptiven Immunantwort ist die Antigenprozessierung und -präsentation bei denen endogene bzw. exogene Antigene nach einer proteolytischen Fragmentierung durch Kopplung an die Haupthistokompatibilitätskomplexe MHC I bzw. II an die Oberfläche kernhaltiger Zellen transportiert und den T-Zellen präsentiert werden [40, 208].

Die Antigenprozessierung und -präsentation war nur 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant reguliert., nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ -Strahlung und 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ . Dem ähnlich zeigten Sokolov *et al.* [209], die humane Lungenfibroblasten mit  $^{125}\text{IdU}$  bzw. mit  $\gamma$ -Strahlung bestrahlten und dabei mit äqui-gentoxischen Dosen arbeiteten, dass nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung der Signalweg der Antigenprozessierung und -präsentation auf der Genexpressionsebene signifikant überrepräsentiert war. Bezüglich der Antigenprozessierung und -präsentation waren in Jurkat-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung 5 Gene für Hitzeschockproteine (HSP), im Detail 3 Gene aus der HSP70- und 2 Gene aus der HSP90-

Familie, herunterreguliert (siehe Anhang). HSP stabilisieren die Konformation geschädigter Proteine und helfen bei ihrer Renaturierung bzw. markieren irreversibel geschädigte Proteine für die Degradation durch Proteasomen. Bei der Antigenprozessierung und -präsentation vermitteln HSP die Degradation endogener als auch exogener Proteine, die schließlich von MHC I bzw. II präsentiert werden können [228].  $\gamma$ -Bestrahlung bewirkt nicht nur eine Konformationsänderung von Proteinen durch direkte bzw. indirekte Schäden sondern auch auf der Ebene der Proteinneusynthese. Sowohl die konformationsveränderten als auch die neusynthetisierten Proteine werden im Rahmen der Antigenprozessierung und -präsentation degradiert und an MHC I Moleküle gebunden, so dass die Oberflächenexpression von MHC I Molekülen zunimmt [183]. Durch die Induktion der Antigenprozessierung und -präsentation nach  $\gamma$ -Bestrahlung, aber auch durch die konformationschädigende Wirkung auf Proteine durch  $\gamma$ -Bestrahlung selbst [201], wurden vermutlich die Expression der *HSP70*- bzw. *HSP90*-Gene in Jurkat-Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung schnell hochreguliert und nach erfolgreicher Wirkung 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung möglicherweise herunterreguliert. Dementsprechend zeigten Kim *et al.* [111] in Rädertierchen, dass die Expression von *HSP70* und *HSP90 $\alpha$*  1 bis 3 h nach UV-Bestrahlung anstieg, dann abfiel und schließlich 24 h nach UV-Bestrahlung gegenüber der Kontrolle herunterreguliert war. Hingegen zeigten Zhang *et al.* [254] in Jurkat-Zellen nach UV-induzierter Apoptose eine sofortige Herunterregulation des konstitutiv überexprimierten HSP-Gens *HSP90 $\beta$* .

HSP sind in vielen Krebsarten überexprimiert und zeigen eine antiapoptotische Wirkung [74]. Wenn durch  $\gamma$ -Bestrahlung Apoptose in der Krebszelllinie Jurkat induziert wird (siehe 3.4), wäre es vermutlich nachvollziehbar, dass keine neuen HSP mehr benötigt werden, was möglicherweise auch dazu führte, dass die zuvor vermutlich konstitutiv überexprimierten *HSP70*- bzw. *HSP90*-Gene nach  $\gamma$ -Bestrahlung herunterreguliert wurden.

### 4.6.3.7 Die Regulation der Transkription

Die Geneexpressionsanalyse der biologischen Prozesse ergab, dass nur nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ - und 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung die Regulation der Transkription signifikant überrepräsentiert war. Dabei induzierte  $^{123}\text{IdU}$  mit 40 von insgesamt 344 signifikant regulierten Genen sehr effizient die Regulation der Transkription, während bei den 1321 bzw. 596 signifikant regulierten Genen nach 10 Gy  $\gamma$ - bzw. 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung keine signifikante Überrepräsentation der Transkriptionsregulation vorlag. Dem ähnlich dokumentierten Sokolov *et al.* [210], die humane Lungenfibroblasten mit  $^{125}\text{IdU}$  bzw. mit  $\gamma$ -Strahlung exponierten und dabei mit äquigentoxischen Dosen arbeiteten, dass nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition mehr transkriptionsregulierende

Gene verändert waren als nach  $\gamma$ -Bestrahlung, obwohl insgesamt ca. 11-mal weniger Gene nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition reguliert waren als nach  $\gamma$ -Bestrahlung.

Während in der vorliegenden Arbeit die  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -bestrahlten Jurkat-Zellen ihre gesamte Dosis in einem sehr kurzen Zeitraum erhielten und erst 24 h nach Exposition geerntet wurden, wurden die  $^{123}\text{IdU}$ -exponierten Zellen bis zu ihrer Ernte 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition beständig bestrahlt. Diese permanente DNA-Schädigung bis kurz vor der Zellernte könnte eventuell ursächlich für die effizientere Induktion der Transkriptionsregulation nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition im Vergleich zu  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Bestrahlung verantwortlich sein, da die Transkription zu den ersten Prozessen gehört, die nach strahleninduzierter DNA-Schädigung reguliert wird [257].

### 4.6.3.8 Die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion

Zytokine binden an Rezeptoren auf der Oberfläche anderer Zellen, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet werden, die schließlich zur Aktivierung von bestimmten Genen führen. Zytokine sind u. a. an der Ontogenese, Gewebereparatur, Immunabwehr, Entzündung, Aufrechterhaltung der Körperprozesse und am Zellsterben beteiligt [127].

Der Signalweg der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion war in der vorliegenden Arbeit nur nach 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 1 Gy  $\alpha$ - und 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung signifikant überrepräsentiert. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung konnten Knops *et al.* [114] eine signifikante Überrepräsentation der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion in humanen Lymphozyten zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb des Signalweges der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition drei Gene aus der Familie der Tumornekrosefaktoren reguliert (siehe Anhang). Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass Tumornekrosefaktoren u. a. bei der strahleninduzierten Apoptoseregulation eine Rolle spielen [10]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition Apoptose induziert (siehe 3.4).

### 4.6.3.9 Der Kalziumsignalweg

Der Kalziumsignalweg ist an mehreren zellulären Prozessen beteiligt, u. a. bei der Apoptose, Zellzyklusregulation, Zelldifferenzierung, beim generellen Metabolismus sowie bei der Induktion und Entwicklung von Leukämien [200].

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Signalwegeanalyse, dass der Kalziumsignalweg nur 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung, nicht aber nach Exposition mit den Äqui-Effektdosen 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$  und 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung signifikant überrepräsentiert war. In humanen Keratinozyten wurde

nach Protonen-Bestrahlung ebenfalls eine Hochregulation von drei Genen, die für den Kalziumsignalweg relevant waren, beobachtet [138].

#### **4.7 Identifizierung von Kandidatengenen, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben**

Basierend auf der vergleichenden Analyse der Microarray-Daten wurden mögliche Kandidatengene für die Diskriminierung der Strahlenqualitäten identifiziert und mit Hilfe der qRT-PCR verifiziert. Kleinere auftretende Abweichungen zwischen Microarray-Technologie und qRT-PCR könnten durch den kleineren dynamischen Messbereich der Microarray-Technologie begründet werden. Vor allem kleine Unterschiede in der mRNA-Menge (< 2-fach) können mit der qRT-PCR akkurater detektiert werden als mit dem Microarray, was insbesondere bei generell gering exprimierten Genen gilt [49, 148]. So zeigten Liu *et al.* [123] bei stark exprimierten Genen höhere Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen von DNA-Microarray und qRT-PCR als bei gering exprimierten Genen.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Analyse der Microarray- und qRT-PCR-Daten die Kandidatengene *PPP1R14C*, *TNFAIP8L1*, *DNAJC1*, *PRTFDC1*; *KLF10* bzw. *TNFAIP8L1* identifiziert, die die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition;  $\gamma$ - vs.  $\alpha$ -Strahlung bzw.  $\alpha$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition erlaubten.

##### **4.7.1 Funktion und Strahlenrelevanz der Kandidatengene, die die Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlauben**

###### **4.7.1.1 Das Gen *KLF10***

Beim Vergleich der Genexpressionen 24 h nach  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Bestrahlung wurde das Gen *KLF10* als Kandidatengen identifiziert, das die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ -Strahlung und  $\alpha$ -Strahlung zuließ. *KLF10* auch bekannt als TIEG bzw. TIEG1 spielt beim TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg eine Rolle und ist für die Apoptoseinduktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferations- und Entzündungshemmung wichtig [219]. Der TGF- $\beta$ -Rezeptor phosphoryliert Smad2/Smad3, welche dann mit Smad4, als Smad-Komplex in den Zellkern transloziert werden, um dort die Expression von *KLF10* zu induzieren. Daraufhin inhibiert bzw. aktiviert *KLF10* die Expression von Smad7 bzw. Smad2, welches die Verstärkung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalwegs bewirkt [212].

Es wurde bereits nachgewiesen, dass durch die strahleninduzierte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) in der Zelle der TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg in humanen Zellen aktiviert werden kann [112, 237]. Zudem wurde gezeigt, dass bei einer ROS-induzierten Apoptose in humanen Hepatomzellen auch die Expression von *KLF10*

induziert wird [185]. Daher wäre die strahleninduzierte 1,9-fache Hochregulation der Expression von *KLF10*, wie sie in der vorliegenden Arbeit 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung in Jurkat-Zellen gezeigt wurde, sehr plausibel. Eine eindeutige Erklärung, warum währenddessen *KLF10* 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung eine 1,3-fache Herunterregulation zeigte, liegt zum momentanen Zeitpunkt nicht vor. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die *KLF10*-Expression schneller nach  $\alpha$ -Bestrahlung als nach  $\gamma$ -Bestrahlung induziert wurde und dass 24 h nach  $\alpha$ -Bestrahlung die *KLF10*-Expression wieder auf bzw. unter das Kontrollniveau sank, während 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung die *KLF10*-Expression noch hochreguliert war. So zeigten Cao *et al.* [27] bezüglich der Kinetik der *KLF10*-Expression in Jurkat-Zellen, dass nach Zugabe von TGF- $\beta$  *KLF10* schnell induziert wurde, nach 90 min bereits das Maximum der Expression erreicht wurde und nach 24 h die *KLF10*-Expression unter das Niveau der Kontrollzellen sank.

Eine strahleninduzierte signifikante Hochregulation der Expression von *KLF10* alias *TIEG*, wie sie in der vorliegenden Arbeit nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung nachgewiesen wurde, wurde auch von Sokolov *et al.* [210] in humanen Lungenfibroblasten nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlung bzw.  $^{125}\text{IdU}$  gezeigt. Dabei wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, mit Äqui-Effektdosen bestrahlt. Während Sokolov *et al.* [210] eine signifikante Hochregulation von *KLF10* alias *TIEG* nach Exposition mit  $^{125}\text{IdU}$  zeigten, konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Regulation von *KLF10* nach Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  nachgewiesen werden. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass pro  $^{125}\text{IdU}$ -Zerfall mehr Energie deponiert wird als bei  $^{123}\text{IdU}$  und demzufolge u. a. die DSB-Induktion nach  $^{125}\text{IdU}$ -Exposition effektiver ist als nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition [134].

Normalerweise steigt nach TGF- $\beta$  Zugabe die Expression von *KLF10* an, wodurch infolgedessen die Proliferation gehemmt wird [219]. Zwar stieg in Jurkat-Zellen die Expression von *KLF10* nach TGF- $\beta$  Zugabe an, jedoch zeigte sich keine Proliferationshemmung [94, 167]. Zudem konnte eine Überexpression von *KLF10* die über den TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg vermittelte Proliferationshemmung in Jurkat-Zellen wiederherstellen [27]. Demzufolge ist in Jurkat-Zellen das Proteinprodukt von *KLF10* womöglich nicht funktional. Daher ist es fraglich, ob die Expression von *KLF10* nach  $\gamma$ -Bestrahlung beispielsweise auch an der Apoptoseregulation in Jurkat-Zellen beteiligt war.

##### 4.7.1.2 Das Gen *TNFAIP8LI*

Mit *TNFAIP8LI* wurde ein Kandidatengen für die Diskriminierung von  $\gamma$ -Strahlung gegenüber  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und  $\alpha$ -Strahlung gegenüber  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition identifiziert.

TNFAIP8L1, auch bekannt als TIPE1, ist durch einen hohen mRNA-Level in vielen humanen Karzinom-Zelllinien charakterisiert und ist an der Karzinogenese, Zellsekretion und Zelltodregulation beteiligt [47]. In Bezug auf die Zelltodregulation wurde gezeigt, dass die Überexpression von *TNFAIP8L1* in humanen Hepatomzellen Apoptose induzierte [213]. Zudem wurde dokumentiert, dass in Mausfibrosarkomzellen bzw. Mausfibroblasten die Expression von *TNFAIP8L1* an der Induktion von Nekroptose bzw. Apoptose beteiligt war [82]. Daher wäre es plausibel, dass die strahleninduzierte Regulation der *TNFAIP8L1*-Expression, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, an der Regulation der Apoptose bzw. Nekroptose in Jurkat-Zellen beteiligt war.

Es wurde auch gezeigt, dass die Expression von *TNFAIP8L1* nach oxidativen Stress via ROS erfolgen kann [75], so dass die durch ionisierende Strahlung produzierten ROS möglicherweise für die Hochregulation 6 h nach der 20-stündigen Exposition mit  $^{123}\text{IdU}$  verantwortlich sein könnten. Allerdings erklärte dies nicht, warum 6 h nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung *TNFAIP8L1* herunterreguliert war. Da bekannt ist, dass die Expression von *TNFAIP8L1* bereits 1 h nach ROS-induzierten oxidativen Stress erfolgen kann [75], wurde *TNFAIP8L1* in Jurkat-Zellen möglicherweise unmittelbar nach  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung stark hochreguliert. Aufgrund eines sehr hohen Levels an Genprodukt könnte dann 6 h nach Bestrahlung eine Herunterregulation von *TNFAIP8L1* erfolgt sein. Dass im Gegensatz dazu nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition die Expression von *TNFAIP8L1* hochreguliert war, ließe sich dadurch erklären, dass bis zur Ernte der Zellen, 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition, permanent ROS durch den kontinuierlichen  $^{123}\text{I}$ -Zerfall gebildet wurden.

### 4.7.1.3 Das Gen *PPP1R14C*

Beim Vergleich der Genexpressionen wurde 6 h nach der 20-stündigen  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und 6 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung *PPP1R14C* als weiteres Kandidatengen identifiziert, welches die Diskriminierung von  $\gamma$ -Strahlung gegenüber  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zuließ.

PPP1R14C alias KEPI, wird über PKC phosphoryliert und inhibiert in diesem Zustand PP1. Es wurde gezeigt, dass im Vergleich zu primären Zellen *PPP1R14C* in Melanom- und Brustkrebszellen reduziert bzw. nicht exprimiert wurde [52, 125]. Eine Verbindung von *PPP1R14C* mit ionisierender Strahlung wurde nur von Datta *et al.* [53] gezeigt, die bei Mäusen 2 Monate nach 2 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung eine Regulation von *PPP1R14C* in Brustdrüsenzellen nachwiesen. Eine wissenschaftlich fundierte Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete differentielle Regulation von *PPP1R14C* nach  $\gamma$ -Bestrahlung bzw.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition kann zum momentanen Zeitpunkt nicht gegeben werden.

#### 4.7.1.4 Das GEN *DNAJC1*

DNAJC1, auch bekannt als MTJ1 bzw. HTJ1, ist ein Transmembran- und Hitzeschockprotein mit verschiedenen Funktionen. DNAJC1 interagiert über seine N-terminale Domäne als Co-Chaperon im endoplasmatischen Retikulum mit BiP/GRP78, einem Chaperon aus der HSP70-Familie, welches bei der Proteinfaltung bzw. -translokation, Apoptose, und Immunregulation eine Rolle spielt [140, 162]. Zudem vermittelt DNAJC1 über seine C-terminale Domäne Protein-Protein-Interaktionen, die möglicherweise beim Chromatin-*Remodeling* eine Rolle spielen [119]. Eine Assoziation von *DNAJC1* mit ionisierender Strahlung wurde bisher nicht beschrieben. Allerdings wäre eine strahlenbedingte Regulation von *DNAJC1* plausibel, da beispielsweise das Chromatin-*Remodeling* nach ionisierender Bestrahlung sehr wichtig für die DSB-Reparatur ist [176].

In der vorliegenden Arbeit wurde *DNAJC1* als Kandidatengen identifiziert, welches die Diskriminierung von  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ. Eine Erklärung dafür, dass *DNAJC1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung hochreguliert wurde, während es 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition herunterreguliert bzw. nicht reguliert wurde, kann momentan nicht gegeben werden.

#### 4.7.1.5 Das Gen *PRTFDC1*

Die Funktion des humanen Proteins PRTFDC1 ist momentan noch nicht geklärt. PRTFDC1 zeigte eine Homologie zu HPRT, welches beim Recycling von Purinnukleotiden beteiligt ist. Dabei zeigte PRTFDC1 aber nicht die gleiche katalytische Aktivität wie HPRT, so dass eine direkte katalytische Rolle beim Purinnukleotidmetabolismus ausgeschlossen werden kann [242]. Keebaugh *et al.* [109] konnten zeigen, dass *PRTFDC1* ein genetischer Modifikator der HPRT-Defizienz in Mäusen war, welches aber laut den Autorinnen und Autoren nicht unbedingt auf den Menschen übertragbar ist, da sich Mensch und Maus im Purinnukleotidmetabolismus unterscheiden und unterschiedliche Phänotypen zeigen. Zudem wurde *PRTFDC1* als mögliches Tumorsuppressorgen in Krebszellen [26, 220] und als relevantes Gen bei Menschen mit Posttraumatischer Belastungsstörung identifiziert [66]. *PRTFDC1* wurde in der vorliegenden Arbeit als Kandidatengen identifiziert, welches die Diskriminierung von  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$  zuließ. Bisher konnte aber noch keine Erklärung gefunden werden, warum *PRTFDC1* 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung hochreguliert war, während es 6 h nach 20-stündiger  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition herunterreguliert bzw. nicht reguliert war.



#### 4.7.2 Vergleichende Analyse der identifizierten Gensignaturen mit bereits publizierten Microarray-Genexpressionsstudien

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die nach  $\gamma$ -,  $\alpha$ - und  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition die Genexpression von drei Strahlenqualitäten miteinander vergleicht, um Gene bzw. Gensignaturen zu identifizieren, mittels deren die Strahlenqualitäten eindeutig voneinander diskriminiert werden können. Daher ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit bestehenden Studien sehr schwierig. Bisher gibt es nur wenige Microarray-Genexpressionsstudien, die überhaupt verschiedene Strahlenqualitäten diesbezüglich miteinander verglichen. So identifizierten Ding *et al.* [58] in einer humanen Bronchialepithelzelllinie nach Exposition mit  $\gamma$ -Strahlung, Eisen- und Silizium-Ionen eine aus 73 Genen bestehende Signatur, die es erlaubte die Strahlenqualitäten voneinander zu unterscheiden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionen nach Exposition mit den unterschiedlichen Strahlenqualitäten zu ermöglichen, nutzten sie, vergleichbar zur vorliegenden Arbeit, ebenfalls Äqui-Effektdosen. Ding *et al.* [58] beschrieben Gene, die bestimmte Signalwege spezifisch nur bei einer Strahlenqualität aktivierten. Hierbei wurden die Gene *THBS1* und *SH3GL3*, die beim Apoptosesignalweg eine Rolle spielen und in der Studie nur nach  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant reguliert waren, identifiziert. Hingegen war die Expression des Gens *APH1B*, welches im *Notch*-Signalweg involviert ist, nur nach Exposition mit Eisen-Ionen signifikant verändert. Des Weiteren zeigten Ding *et al.* [58], dass die Gene *BLNK*, *PLD1* und *PLD3*, die beim Phospholipase C-Signalweg beteiligt sind, nur nach Exposition mit Silizium-Ionen signifikant reguliert waren.

Chauhan *et al.* [34] identifizierten in humanen Keratinozyten die Gene *CCNB2*, *NEK2* bzw. *BUB1*, *CDC20*, *AURKA*, die an der Zellzyklusregulation bzw. Mitose beteiligt sind. Diese Gene waren nach 1 und 1,5 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung signifikant hochreguliert, jedoch nach gleichen Strahlendosen  $\gamma$ -Bestrahlung nicht reguliert. Allerdings konnte bei der Validierung der Daten mittels qRT-PCR nur beim Gen *CDC20* eine signifikante Regulation nach  $\alpha$ -Bestrahlung verifiziert werden. Gegensätzlich zu der vorliegenden Arbeit exponierten Chauhan *et al.* [34] die Zellen nicht mit Äqui-Effektdosen.

Im Gegensatz zu Chauhan *et al.* [34] zeigten Danielsson *et al.* [51] in humanen Vorhautfibroblasten, dass die an der Mitose beteiligten Gene *CDC20*, *BUB1* und *NEK2* nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung im Vergleich mit 1 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung herunter- und nicht hochreguliert waren. Des Weiteren identifizierten Danielsson *et al.* [51] die bei der DNA-Schadensantwort involvierten Gene *CDKN1A*, *SESNI* und *ZMAT3*, die nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung stark jedoch nach 1 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung nur in geringen Umfang hochreguliert waren, welches allerdings

auch durch die größere biologische Wirksamkeit der Hoch-LET gegenüber der Niedrig-LET Strahlung erklärbar wäre [229]. Außerdem ist im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit zu betonen, dass Danielsson *et al.* [51] die Zellen nicht mit Äqui-Effektdosen exponierten und zudem ihre Microarray-Daten nicht mittels qRT-PCR validierten, welches aber beim Umgang mit Microarray-Daten empfohlen wird [37].

Die Studie von Kurpinski *et al.* [121] erwähnte die Gene *PIP5K1A*, *DDX17* und *AP1S1*, die in humanen mesenchymalen Stammzellen nach Eisen-Ionen- bzw.  $\gamma$ -Bestrahlung unterschiedliche strahlenqualitätsspezifische Antworten zeigten. Außerdem wurde das Gen *CCNE2* beschrieben, das nach Exposition mit Eisen-Ionen signifikant herunterreguliert war, jedoch nach dosisgleicher Röntgenbestrahlung kaum Genexpressionsveränderungen zeigte.

Bezüglich der Genexpression nach AEE- bzw. Niedrig-LET Exposition sind die Untersuchungen von Sokolov *et al.* [209] bzw. Sokolov *et al.* [210] zu erwähnen, die in humanen Lungenfibroblasten beschrieben, dass nach  $^{125}\text{IdU}$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition sehr wenige Gene unterschiedlich exprimiert waren. Jedoch erfolgte keine ausreichende Analyse der Expressionsdaten bzw. Dokumentation der Gennamen.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Kandidatengene *PPP1R14C*, *TNFAIP8LI*, *DNAJC1*, *PRTFDC1* und *KLF10* wurden in keiner der bereits erwähnten Microarray-Genexpressionsstudien als Gene beschrieben, die eine Diskriminierung der Strahlenqualität erlauben. Abgesehen davon, wurde, wie bereits unter 4.7.1 ausführlich diskutiert, ein direkter Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Genexpression überhaupt nur bei *PPP1R14C* und *KLF10* in der Literatur beschrieben.

Dass die in Jurkat-Zellen identifizierten Kandidatengene in keiner der bereits erwähnten Microarray-Genexpressionsstudien beschrieben wurden, könnte eventuell damit zusammenhängen, dass Jurkat-Zellen Krebszellen sind [203], während bei den anderen Microarray-Genexpressionsstudien [34, 51, 58, 121] primäre bzw. immortalisierte Zellen verwendet wurden. Krebszellen sind genomisch instabil, der Verlust bzw. die teilweise mehrfache Verdopplung verschiedener Gene können die Genexpressionsmuster der Zellen verändern [232]. Jedoch zeigten auch die Microarray-Genexpressionsstudien, die primäre bzw. immortalisierte Zellen verwendeten [34, 51, 58, 121], kaum gemeinsame Schnittmengen. Von den insgesamt 13 Genen, die in den Microarray-Genexpressionsstudien eine unterschiedliche Genexpression nach Hoch- bzw. Niedrig-LET Bestrahlung in primären humanen Keratinozyten [34], primären humanen Vorhautfibroblasten [51] bzw. humanen mesenchymalen Stammzellen [121] zeigten, konnten keine Gene der von Ding *et al.* [58] identifizierten Gensignatur zugeordnet werden, die aus 73 Genen besteht und eine

Diskriminierung zwischen Hoch- bzw. Niedrig-LET Strahlung in humanen immortalisierten Bronchialepithelzellen erlaubt [58]. Nur die Gene *CDC20*, *BUB1* und *NEK2* wurden überhaupt bei zwei Studien übereinstimmend identifiziert [34, 51]. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass die in den verschiedenen Studien nach Bestrahlung gefundenen Gensignaturen eventuell zelltypspezifisch sein könnten, so dass auch die in bestrahlten Jurkat-Zellen gefundene Gensignatur der vorliegenden Arbeit möglicherweise spezifisch für lymphoblastoide Zellen ist. So vermuteten Ding *et al.* [58] bzw. Amundson *et al.* [3], dass die Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung möglicherweise zelltypspezifisch sein bzw. sogar innerhalb einer Gruppe von Zelllinien gleichen Zelltyps variieren können. Dem konträr zeigte eine Studie mit 60 verschiedenen Zelllinien (NCI-60), dass eher die basale Genexpression zelltypspezifisch ist, dass aber die strahleninduzierten Genexpressionsveränderungen sich nicht kohärent in Abhängigkeit vom Zelltyp unterscheiden [5].

Andererseits könnten auch andere Ursachen dazu beitragen, dass beim Vergleich der vorliegenden Studie mit den bereits erwähnten Microarray-Genexpressionsstudien [34, 51, 58, 121] nur wenige gemeinsam regulierte Gene gefunden wurden, die nach Hoch- bzw. Niedrig-LET Bestrahlung eine Diskriminierung der Strahlenqualität erlauben. So wurde zum Beispiel bei der vorliegenden Studie eine andere Microarray-Plattform verwendet als bei den anderen Arbeiten [34, 51, 58, 121]. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass Genexpressionsdaten verschiedener Studien, v. a. wenn verschiedene Microarray-Plattformen verwendet werden, zunächst wenig miteinander korrelieren können, dass aber die Standardisierung bzw. Optimierung des RNA-Labeling, der Hybridisierung, der Daten-Normalisierung, -Prozessierung und -Filterung die Korrelation der Daten deutlich verbessern können [241, 252]. Außerdem können beim Vergleich verschiedener Microarray-Plattformen Probleme bei der Annotation auftreten bzw. unterschiedliche Probe-Sequenzen die Signalintensität beeinflussen [252]. Ein weiteres Problem beim Datenvergleich verschiedener Microarray-Plattformen könnte eine teilweise unterschiedliche bzw. lückenhafte Detektion von alternativen Spleißvarianten sein [213]. Alternatives Spleißen, welches bei 90% der humanen Gene vorkommen kann, wurde sowohl für primäre als auch für maligne Zellen für diverse Zelltypen nach ionisierender Bestrahlung beschrieben [66, 213]. Daher wäre es nicht unwahrscheinlich gewesen, dass bei der vorliegenden Studie und den bereits erwähnten Microarray-Genexpressionsstudien [34, 51, 58, 121] durch eine Optimierung bzw. Standardisierung der Microarray-Methode und -Auswertung mehr gemeinsam regulierte Gene gefunden worden wären, die eine Diskriminierung der Strahlenqualität mittels Genexpression erlauben würden.

Schließlich kann daher die Ursache dafür, dass beim Vergleich der Genexpression der T-Lymphom-Zelllinie Jurkat mit anderen primären bzw. immortalisierten Zellen verschiedener Zelltypen [34, 51, 58, 121] keine gemeinsam regulierten Gene gefunden wurden, die eine Diskriminierung der Strahlenqualitäten erlaubten, nicht ausschließlich darin gesucht werden, dass Jurkat-Zellen Krebszellen sind bzw. dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene Gensignatur nach Bestrahlung möglicherweise zelltypspezifisch bzw. spezifisch für Jurkat-Zellen ist.

Obwohl die Genexpressionsanalyse der Microarray-Daten mittels Venn-Diagramm ergab (siehe Abb. 24), dass lediglich 80 Gene gemeinsam reguliert, jedoch 165, 318 bzw. 995 Gene exklusiv nach  $^{123}\text{IdU}$ -,  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Exposition reguliert waren, wurden nur wenige Kandidatengene identifiziert, die überhaupt die Diskriminierung der verschiedenen Strahlenqualitäten erlaubten. Dies liegt ursächlich darin begründet, dass bei der Datenauswertung, die der Darstellung im Venn-Diagramm zugrunde liegt, immer nur jeweils eine Strahlenqualität unabhängig von den beiden anderen betrachtet wurde. Es wurden nur Gene herausgefiltert, die eine signifikante Hoch- bzw. Herunterregulation mit einem signifikanten Expressionsunterschied  $> 1,5$ -fach gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle zeigten. Dagegen wurden bei der Identifizierung der Kandidatengene zur Diskriminierung der Strahlenqualität nur die Gene mitberücksichtigt, die gegenüber ihrer unbestrahlten Kontrolle bei jeweils einer Strahlenqualität eine signifikante Hoch- bzw. Herunterregulation ( $>1,5$ -fach) zeigten und zudem bei einer zweiten Strahlenqualität keine Regulation (Expressionsunterschied =  $1\text{-fach} \pm 0,1$ ) oder gar eine gegensätzliche Regulation aufwiesen. Diese stringente Auswertebedingung reduzierte massiv die Anzahl möglicher Kandidatengene. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dieser Auswertestrategie dennoch erstmalig die Kandidatengene *PPP1R14C*, *TNFAIP8L1*, *DNAJC1*, *PRTFDC1*; *KLF10* bzw. *TNFAIP8L1* identifiziert werden, die über differentielle Genexpressionsänderungen die Diskriminierung zwischen  $\gamma$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition;  $\gamma$ - vs.  $\alpha$ -Strahlung bzw.  $\alpha$ - vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition ermöglichten. Daher scheint die Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray-Technologie grundsätzlich die Diskriminierung verschiedener Strahlenqualitäten zu erlauben. Allerdings ist die Integration der identifizierten Kandidatengene für die Anwendung bei genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden eher als schwierig zu erachten, da die Anzahl der identifizierten Gene gering ist. So erfolgte die Diskriminierung von  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Strahlung bzw.  $\alpha$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition über jeweils nur ein Gen, welches in Bezug auf eine mögliche Vorhersagegenauigkeit der Strahlenqualität statistisch schwach wäre.

#### **4.8 Vergleichende Analyse der Genexpression in Jurkat-Zellen und Lymphozyten nach $\gamma$ -Bestrahlung**

Der Vergleich der vorliegenden Studie, bei der die Genexpression in der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat u. a. nach  $\gamma$ -Exposition untersucht wurde, mit der Genexpressionsstudie von Knops *et al.* [114], bei der humane periphere Blutlymphozyten (PBL) *ex vivo*  $\gamma$ -bestrahlt wurden, hat den Zweck zu untersuchen, inwieweit der gemeinsame zelluläre Ursprung von PBL und Jurkat-Zellen sich möglicherweise auf Ebene der Genexpression widerspiegelt. Der experimentelle Teil beider Studien wurde in der gleichen Arbeitsgruppe des Forschungszentrums Jülich durchgeführt, so dass die identische Microarray-Plattform (Agilent) genutzt wurde.

Knops *et al.* [114] untersuchten die Genexpression in PBL nach *ex vivo*  $\gamma$ -Bestrahlung mit dem Ziel Markergene für die Dosisabschätzung zu identifizieren. Dabei wurden Microarrays, basierend auf vier Strahlendosen (0,5, 1, 2, 4 Gy) und der unbestrahlten Kontrolle, drei Zeitpunkten (6, 24, 48 h) mit gepoolten RNA-Proben von sechs Spendern beladen. Knops *et al.* [114] konnten hierbei zeigen, dass mehr Gene eine signifikant veränderte Genexpression 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung aufwiesen als kurz nach Exposition (6 h). Dem analog konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden, dass in Jurkat-Zellen 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mehr Gene signifikant reguliert waren als 6 h nach Exposition. In Bezug auf die Regulationen der biologischen Prozesse bzw. Signalwege waren nach  $\gamma$ -Bestrahlung die Nukleosomenorganisation, der Systemische Lupus erythematoses Signalweg, die Apoptoseregulation, die Antigenprozessierung und -präsentation, die Zellzyklusregulation sowie die DNA-Reparatur bzw. -Schadensantwort sowohl in den Jurkat-Zellen der vorliegenden Arbeit als auch in den PBL von Knops *et al.* [114] signifikant verändert.

Hinsichtlich der Nukleosomenorganisation und dem Systemische Lupus erythematoses Signalweg waren 13 Histongene sowohl bei der Studie von Knops *et al.* [114] als auch in der vorliegenden Arbeit nach  $\gamma$ -Bestrahlung signifikant reguliert. Während die Histongene nach  $\gamma$ -Bestrahlung bei Knops *et al.* [114] hochreguliert waren, waren die Histongene in der vorliegenden Arbeit größtenteils herunterreguliert, welches im Einklang mit anderen Studien nach ionisierender Bestrahlung stand (siehe 4.6.3.1).

Bezüglich der Apoptoseregulation konnten Knops *et al.* [114] zeigen, dass in PBL nach  $\gamma$ -Bestrahlung der P53-Signalweg mit 20 Genen signifikant reguliert war. Von diesen 20 P53-relevanten Genen war nur das Gen *BBC3* auch innerhalb der 62 Gene, die bei der Apoptoseregulation der  $\gamma$ -bestrahlten Jurkat-Zellen der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielten, gemeinsam reguliert. Bei Jurkat-Zellen, die P53-defizient sind [31, 128] aber

trotzdem Apoptose nach Bestrahlung zeigten (siehe 3.4), spielen daher offensichtlich P53-unabhängige Apoptosewege eine wichtige Rolle. Die Antigenprozessierung und -präsentation, bei der nach  $\gamma$ -Bestrahlung 10 Gene in Jurkat-Zellen bzw. 17 Gene in den PBL [113] signifikant reguliert waren, war nur das Gen *CD8A* gemeinsam reguliert. Hinsichtlich der Zellzyklusregulation, bei der nach  $\gamma$ -Bestrahlung 9 bzw. 10 Gene in Jurkat-Zellen bzw. PBL [113] signifikant reguliert waren, war kein Gen gemeinsam reguliert. Auch bei der DNA-Reparatur und -Schadensantwort, bei der nach  $\gamma$ -Bestrahlung 4 bzw. 15 Gene in Jurkat-Zellen bzw. PBL [113] signifikant verändert waren, gab es keine gemeinsame Schnittmenge. Andere biologische Prozesse wie z.B. der Steroidmetabolismus bzw. die Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion und Proteolyseregulation waren nach  $\gamma$ -Exposition in Jurkat-Zellen bzw. in PBL exklusiv reguliert. Insgesamt waren nur ca. 14% der Gene, die in den  $\gamma$ -bestrahlten PBL von Knops *et al.* [114] signifikant reguliert waren, auch in den Jurkat-Zellen der vorliegenden Studie nach  $\gamma$ -Exposition signifikant reguliert.

Zusammenfassend lässt sich nach Vergleich der vorliegenden Studie mit der von Knops *et al.* [114] feststellen, dass die Genexpression in Jurkat-Zellen bzw. PBL nach  $\gamma$ -Bestrahlung eher zu einem späten (24 h) als zu einem frühen (6 h) verändert wird und dass auch einige biologische Prozesse bzw. Signalwege gemeinsam reguliert sind, dass aber die Schnittmenge an gemeinsam regulierten Genen, insbesondere innerhalb der gemeinsam regulierten Prozesse und Signalwege, gering ist. Die geringe Schnittmenge an gemeinsam regulierten Genen ist möglicherweise darin begründet, dass es sich bei PBL um primäre Zellen und bei Jurkat-Zellen um Krebszellen [203] handelt. Ein Merkmal genomisch instabiler Krebszellen ist der Verlust bzw. die teilweise mehrfache Verdopplung verschiedener Gene, welches zur Folge hat, dass sich die Genexpressionsmuster der Zellen verändern können [232]. Ein weiteres Merkmal maligner Zellen ist eine unkontrollierte Proliferation und erhöhte Apoptoseresistenz [180], wobei das Tumorsuppressorprotein P53, welches in 50% aller Tumorarten durch Mutation funktionslos geworden ist [124], eine Schlüsselrolle spielen kann. Nach DNA-Schädigung induziert P53 normalerweise einen Zellzyklusarrest und gibt somit der Zelle Zeit für die Schadens-Reparatur, oder bei irreparabler DNA-Schädigung induziert P53 Apoptose [63, 71]. In P53-Wildtyp-Zellen spielt P53 eine zentrale Rolle bei der Induktion der strahlen-induzierten Genexpressionsantwort [5], welches auch bei Knops *et al.* [114] in PBL demonstriert wurde. Hingegen zeigte sich in Jurkat-Zellen, die P53-defizient sind [31, 128], folglich keine Induktion des P53-Signalwegs.

Die relativ geringe Schnittmenge an gemeinsam signifikant regulierten Genen in Jurkat-Zellen und PBL nach  $\gamma$ -Bestrahlung, ließe die Schlussfolgerung zu, dass der gemeinsame

zelluläre Ursprung von PBL und Jurkat-Zellen sich eher nicht auf der Ebene von strahleninduzierten Genexpressionsveränderungen widerspiegelt. Andererseits ist es fraglich, inwieweit die über Microarray-Analysen bestimmten strahleninduzierten Genexpressionsveränderungen eine Aussage über einen gemeinsamen zellulären Ursprung zulassen. Diesbezüglich ist die Studie von Paul und Amundson [165] erwähnenswert, die auch gepoolte PBL von 5 Spendern *ex vivo*  $\gamma$ -bestrahlten (0,5, 2, 5, 8 Gy) und deren Genexpression 6 und 24 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mittels der Microarray-Plattform von Agilent bestimmten und somit eine gute Vergleichbarkeit mit der Studie von Knops *et al.* [114] bietet. Hierbei waren auch nur 16% der Gene, die in den von Knops *et al.* [114]  $\gamma$ -bestrahlten PBL signifikant verändert waren, auch in den  $\gamma$ -bestrahlten PBL von Paul und Amundson [165] signifikant reguliert. Das ähnelt der 14-prozentigen Schnittmenge der gemeinsam signifikant regulierten Genen in Jurkat-Zellen und in den PBL von Knops *et al.* [114] nach  $\gamma$ -Bestrahlung.

Daher kann auch der bereits diskutierte Krebszellstatus der Jurkat-Zellen nicht ausschließlich dafür verantwortlich gemacht werden, dass es nach  $\gamma$ -Bestrahlung nur wenige gemeinsam regulierte Gene in den PBL von Knops *et al.* [114] und Jurkat-Zellen gibt. Für diese geringe Schnittmenge könnten auch andere Ursachen von Bedeutung sein. Zum einen könnten die in beiden Studien verwendeten unterschiedlich hohen Dosen eine Rolle spielen, da die Anzahl signifikant regulierter Gene in humanen Zellen nach Photonenbestrahlung [97, 114, 170] dosisabhängig ansteigt. Zum anderen wurde zwar bei beiden Studien dieselbe Microarray-Plattform verwendet, aber die Daten-Prozessierung, -Normalisierung und -Filterung war unterschiedlich, welches eine negative Auswirkungen auf die Korrelation zwischen Microarray-Studien haben kann [241, 252]. Beispielsweise erachteten Knops *et al.* [114] Gene mit einem FDR-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant verändert, während diesbezüglich in der vorliegenden Arbeit ein FDR-Wert  $< 0,15$  gewählt wurde (siehe 3.6.2), wobei FDR-Werte von 0,1-0,25 bei Microarray-Genexpressionsstudien durchaus üblich sind [164, 196, 207, 210]. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit nur die signifikant regulierten Gene in der weiteren Analyse verwendet, die eine Hoch- bzw. Herunterregulation mit einem Expressionsunterschied  $> 1,5$ -fach gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle zeigten, während Knops *et al.* [114] auch signifikant regulierte Gene mit einem Expressionsunterschied  $\leq 1,5$ -fach analysierten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es über Genexpressionsanalysen charakteristische Genexpressionsänderungen und robuste Gensignaturen in Jurkat-Zellen zu detektieren, mittels deren die Strahlenqualitäten „ $\gamma$ -Strahlung“, „ $\alpha$ -Strahlung“ und „Auger-Elektronen“ eindeutig voneinander diskriminiert werden können und die gegebenenfalls in genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden Anwendung finden könnten. Hierzu sollten für die drei verwendeten Strahlenqualitäten Äqui-Effektdosen auf Basis der Apoptoseinduktion, der Mikrokernbildung und der  $\gamma$ -H2AX Foci-Bildung identifiziert werden. Für die notwendige Mikrodosimetrie der verwendeten Auger-Elektronen-Emitter (AEE) sollte die zelluläre *Uptake*-Rate und DNA-Einbaukinetiken bestimmt sowie 3D-Zellvermessungen durchgeführt werden. Folgende wichtige Ergebnisse wurden dabei erzielt:

- Erstmalig konnten Kandidatengene identifiziert werden, die mittels Genexpressionsänderung die Diskriminierung der drei Strahlenqualitäten  $\gamma$ -,  $\alpha$ -Strahlung und AEE-Exposition erlauben: vier Gene für  $\gamma$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition (*PPP1R14C*, *TNFAIP8L1*, *DNAJC1* und *PRTFDC1*), jeweils ein Gen für  $\gamma$ -Strahlung vs.  $\alpha$ -Strahlung (*KLF10*) bzw.  $\alpha$ -Strahlung vs.  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition (*TNFAIP8L1*)
- Die Regulationen der biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Nukleosomenorganisation“, „Systemische Lupus erythematosus Signalweg“ sowie „Apoptoseregulation“ waren nach Exposition mit allen drei untersuchten Strahlenqualitäten signifikant verändert.
- Exklusiv waren nach  $\gamma$ -Bestrahlung die biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Positive Regulation der DNA-Reparatur“, „Negative Zellzyklusregulation“, „Steroidmetabolismus und -biosynthese“ sowie „Antigenprozessierung und -präsentation“ signifikant reguliert.
- Nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition waren exklusiv die biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion“ und „Transkriptionsregulation“ signifikant reguliert.
- Nach  $\alpha$ -Bestrahlung war exklusiv der „Kalziumsignalweg“ signifikant reguliert.
- Im Vergleich der drei untersuchten Strahlenqualitäten wurde bei gleicher absorbierter Strahlendosis Apoptose durch  $\alpha$ -Bestrahlung am effektivsten induziert, während für die Mikrokernbildung keine strahlenqualitativen Unterschiede beobachtet wurden.
- Die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität in Jurkat-Zellen war bei gleicher absorbierter Strahlendosis nach  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition im Vergleich mit  $\gamma$ -Bestrahlung stark erhöht,



während die mittlere  $\gamma$ -H2AX Signalintensität nach  $^{123}\text{IdU}$ - und  $\alpha$ -Exposition vergleichbar stark ausgeprägt war.

- Erstmalig wurde in einem Zellsystem gezeigt, dass pro  $^{123}\text{IdU}$ -Zerfall im Mittel 0,16  $\gamma$ -H2AX Foci gebildet werden. Die einzelnen Foci waren dabei bezüglich Größe und Signalintensität vergleichbar mit Foci  $\gamma$ -bestrahlter Zellen, so dass die postulierte Komplexität von DNA-Läsionen nach AEE-Exposition sich in der Morphologie der individuellen  $\gamma$ -H2AX Foci nicht abbildet.
- Für die durchflusszytometrische Analyse von  $\gamma$ -H2AX Signalen wurde eine innovative Auswertestrategie entwickelt und etabliert, die die Verteilung der zellulären  $\gamma$ -H2AX Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Strahlenqualität und vom Zellzyklus berücksichtigt.
- Die 3D-morphometrischen Vermessungen ergaben für Jurkat-Zellen ein mittleres Zell- bzw. Zellkernvolumen von  $1400 \pm 342$  bzw.  $667 \pm 149 \mu\text{m}^3$  und mittlere Zell- bzw. Zellkerndurchmesser von  $13,9 \pm 1,1$  bzw.  $10,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ . Die DNA-Inkorporation von  $^{123}\text{IdU}$  betrug 88% bzw. 69% nach 20-stündiger Exposition bzw. nach 30-minütigem Puls-Labeling. 94% der Zellen zeigten einen  $^{123}\text{IdU}$ -Uptake nach 20-stündiger Exposition.

Erstmalig wurden Auger-Elektronen-Emitter sowohl mit Hoch-LET als auch Niedrig-LET Strahlung bezüglich Genexpression, Apoptoseinduktion, Mikrokern- und  $\gamma$ -H2AX Foci-Bildung vergleichend untersucht. Hierfür war eine eingehende mikrodosimetrische Betrachtung für die verwendeten Auger-Elektronen-Emitter unter Berücksichtigung der zellulären Aufnahmekinetiken, der intrazellulären Lokalisation sowie der Zellgeometrie notwendig, da nur so ein Vergleich der drei Strahlenqualitäten auf Basis der absorbierten Strahlendosis möglich war.

Insgesamt konnte das Hauptziel der vorliegenden Arbeit erreicht werden. Aufgrund der geringen Anzahl der identifizierten Gene, die die Diskriminierung der verschiedenen Strahlenqualitäten erlauben, ist allerdings die Implementierung dieser Gene für die Anwendung bei genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden eher als schwierig zu erachten. Ob die in der vorliegenden Arbeit gefundene Gensignatur zelltypspezifisch bzw. spezifisch für Jurkat-Zellen ist, bleibt spekulativ, da auch Unterschiede bzw. Modifikationen bezüglich der Microarray-Methode und -Auswertung ursächlich dafür verantwortlich sein könnten, dass die in dieser Arbeit in Jurkat-Zellen gefundene Gensignatur bisher nicht in den anderen wenigen Studien, die die Genexpression in Abhängigkeit von der Strahlenqualität untersuchten, beschrieben wurde.

Dennoch sind die gewonnenen Erkenntnisse sehr wertvoll, da sie zeigen, dass die zelluläre Strahlenantwort auf Basis der Genexpression prinzipiell nicht nur bezüglich der Dosishöhe sondern auch bezüglich der Strahlenqualität signifikant unterschiedlich ist.

Weiterführend wäre jetzt zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit identifizierte Gensignatur auch in anderen Zellsystemen, speziell in humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL), auftritt und vergleichbare Aussagen erlaubt. Die Untersuchung in humanen PBL wäre deshalb interessant und wichtig, da PBL und Jurkat-Zellen den gleichen zellulären Ursprung haben und humane PBL bereits in genexpressionsbasierten Biodosimetriemethoden nach Niedrig-LET Photonenstrahlung erfolgreich verwendet wurden [19, 114, 165, 194].

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akudugu, J.M., E.I. Azzam, and R.W. Howell, *Induction of lethal bystander effects in human breast cancer cell cultures by DNA-incorporated Iodine-125 depends on phenotype*. Int J Radiat Biol, 2012. **88**(12): p. 1028-38.
2. Amundson, S.A., M. Bittner, P. Meltzer, J. Trent, and A.J. Fornace, *Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation*. Radiation Research, 2001. **156**(5): p. 657-661.
3. Amundson, S.A., M. Bittner, and A.J. Fornace, *Functional genomics as a window on radiation stress signaling*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5828-5833.
4. Amundson, S.A., R.A. Lee, C.A. Koch-Paiz, M.L. Bittner, P. Meltzer, J.M. Trent, and A.J. Fornace, *Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation*. Molecular Cancer Research, 2003. **1**(6): p. 445-452.
5. Amundson, S.A., K.T. Do, L.C. Vinikoor, R.A. Lee, C.A. Koch-Paiz, J. Ahn, M. Reimers, Y. Chen, D.A. Scudiero, and J.N. Weinstein, *Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen*. Cancer research, 2008. **68**(2): p. 415-424.
6. Ardail, D., M. Maalouf, A. Boivin, O. Chapet, J. Bodennec, R. Rousson, and C. Rodriguez-Lafrasse, *Diversity and Complexity of Ceramide Generation after Exposure of Jurkat Leukemia Cells to Irradiation*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2009. **73**(4): p. 1211-1218.
7. Asaithamby, A. and D.J. Chen, *Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011. **711**(1-2): p. 87-99.
8. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
9. Auger, P., *Sur les rayons secondaires beta produits dans un gaz par des rayons X*. Comptes Rendues Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, 1925. **177**: p. 169-171.
10. Baatout, S., H. Derradji, O. Petitfour, H. von Suchodoletz, and M. Mergeay, *[Mechanisms of radio-induced apoptosis]*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(7): p. 629-37.
11. Balagurumoorthy, P., K. Chen, S.J. Adelstein, and A.I. Kassis, *Auger electron-induced double-strand breaks depend on DNA topology*. Radiat Res, 2008. **170**(1): p. 70-82.
12. Baranowska-Kortylewicz, J., L. Helseth, J. Lai, M. Schneiderman, S. Schneiderman, and G. Dalrymple, *Radiolabeling kit/generator for 5-radiohalogenated uridines*. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 1994. **34**(6): p. 513-521.
13. Bartocci, C. and E.L. Denchi, *Put a RING on it: regulation and inhibition of RNF8 and RNF168 RING finger E3 ligases at DNA damage sites*. Front Genet, 2013. **4**: p. 128.
14. Bashir, M.M., M.R. Sharma, and V.P. Werth, *TNF-alpha production in the skin*. Arch Dermatol Res, 2009. **301**(1): p. 87-91.
15. Baxevanis, A.D. and D. Landsman, *Histone Sequence Database: a compilation of highly-conserved nucleoprotein sequences*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(1): p. 245-7.
16. Bekker-Jensen, S., C. Lukas, R. Kitagawa, F. Melander, M.B. Kastan, J. Bartek, and J. Lukas, *Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks*. Journal of Cell Biology, 2006. **173**(2): p. 195-206.
17. Beucher, A., J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A.A. Goodarzi, A. Krempler, P.A. Jeggo, and M. Lobrich, *ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2*. EMBO J, 2009. **28**(21): p. 3413-27.
18. Bilbao, A., J.S. Prosser, A.A. Edwards, J.C. Moody, and D.C. Lloyd, *The induction of micronuclei in human lymphocytes by in vitro irradiation with alpha particles from plutonium-239*. Int J Radiat Biol, 1989. **56**(3): p. 287-92.

19. Boldt, S., K. Knops, R. Kriehuber, and O. Wolkenhauer, *A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction*. Int J Radiat Biol, 2012. **88**(3): p. 267-76.
20. Booz, J., H.G. Paretzke, E. Pomplun, and P. Olko, *Auger-electron cascades, charge potential and microdosimetry of iodine-125*. Radiat Environ Biophys, 1987. **26**(2): p. 151-62.
21. Boreham, D.R., K.L. Gale, S.R. Maves, J.A. Walker, and D.P. Morrison, *Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: Potential as a biological dosimeter*. Health Physics, 1996. **71**(5): p. 685-691.
22. Boyd, M., A. Sorensen, A.G. McCluskey, and R.J. Mairs, *Radiation quality-dependent bystander effects elicited by targeted radionuclides*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(8): p. 951-8.
23. Bryant, P.E., *Enzymatic Restriction of Mammalian-Cell DNA - Evidence for Double-Strand Breaks as Potentially Lethal Lesions*. International Journal of Radiation Biology, 1985. **48**(1): p. 55-60.
24. Burkart, W., T. Jung, and G. Frasch, *Damage pattern as a function of radiation quality and other factors*. Comptes Rendus de l Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie (Paris), 1999. **322**(2-3): p. 89-101.
25. Burma, S., B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D.J. Chen, *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42462-7.
26. Cai, L.Y., M. Abe, S.I. Izumi, M. Imura, T. Yasugi, and T. Ushijima, *Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers*. Life Sciences, 2007. **80**(16): p. 1458-1465.
27. Cao, Z., A.K. Wara, B. Icli, X. Sun, R.R. Packard, F. Esen, C.J. Stapleton, M. Subramaniam, K. Kretschmer, I. Apostolou, H. von Boehmer, G.K. Hansson, T.C. Spelsberg, P. Libby, and M.W. Feinberg, *Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24914-24.
28. Cataldi, A., V. Di Giacomo, M. Rapino, S. Zara, and R.A. Rana, *Ionizing radiation induces apoptotic signal through protein kinase Cdelta (delta) and survival signal through Akt and cyclic-nucleotide response element-binding protein (CREB) in Jurkat T cells*. Biol Bull, 2009. **217**(2): p. 202-12.
29. Cepheiden, *Schematische Darstellung des Auger-Effekts (KLM-Augerelektron) in einem Atom*. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atom\\_model\\_for\\_Auger\\_process\\_DE.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atom_model_for_Auger_process_DE.svg), 2009(2. Version vom 4. Februar 2009).
30. Chappell, L.J., M.K. Whalen, S. Gurai, A. Ponomarev, F.A. Cucinotta, and J.M. Pluth, *Analysis of Flow Cytometry DNA Damage Response Protein Activation Kinetics after Exposure to X Rays and High-Energy Iron Nuclei*. Radiation Research, 2010. **174**(6): p. 691-702.
31. Chaudhry, M.A., *Analysis of gene expression in normal and cancer cells exposed to gamma-radiation*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2008.
32. Chaudhry, M.A., *Biomarkers for human radiation exposure*. J Biomed Sci, 2008. **15**(5): p. 557-63.
33. Chauhan, V. and M. Howland, *Genomic profiling of a human leukemic monocytic cell-line (THP-1) exposed to alpha particle radiation*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 205038.
34. Chauhan, V., M. Howland, H.B. Greene, and R.C. Wilkins, *Transcriptional and secretomic profiling of epidermal cells exposed to alpha particle radiation*. Open Biochem J, 2012. **6**: p. 103-15.
35. Chauhan, V., M. Howland, A. Mendenhall, S. O'Hara, T.J. Stocki, J.P. McNamee, and R.C. Wilkins, *Effects of alpha particle radiation on gene expression in human pulmonary epithelial cells*. Int J Hyg Environ Health, 2012. **215**(5): p. 522-35.

36. Chen, Y.R., C.F. Meyer, and T.H. Tan, *Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 631-4.
37. Chuaqui, R.F., R.F. Bonner, C.J. Best, J.W. Gillespie, M.J. Flaig, S.M. Hewitt, J.L. Phillips, D.B. Krizman, M.A. Tangrea, and M. Ahram, *Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments*. Nature genetics, 2002. **32**: p. 509-514.
38. Claesson, A.K., B. Stenerlow, L. Jacobsson, and K. Elmroth, *Relative biological effectiveness of the alpha-particle emitter At-211 for double-strand break induction in human fibroblasts*. Radiation Research, 2007. **167**(3): p. 312-318.
39. Claesson, K., K. Magnander, H. Kahu, S. Lindegren, R. Hultborn, and K. Elmroth, *RBE of alpha-particles from (211)At for complex DNA damage and cell survival in relation to cell cycle position*. Int J Radiat Biol, 2011. **87**(4): p. 372-84.
40. Cobb, L.J., D.A. Salih, I. Gonzalez, G. Tripathi, E.J. Carter, F. Lovett, C. Holding, and J.M. Pell, *Partitioning of IGFBP-5 actions in myogenesis: IGF-independent anti-apoptotic function*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 9): p. 1737-46.
41. Collyn-d'Hooghe, M., D. Hemon, R. Gilet, S.B. Curtis, A.J. Valleron, and E.P. Malaise, *Comparative effects of 60Co gamma-rays and neon and helium ions on cycle duration and division probability of EMT 6 cells. A time-lapse cinematography study*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1981. **39**(3): p. 297-306.
42. Coster, D. and R.D. Kronig, *A new type of auger effect and its influence on the x-ray spectrum*. Physica, 1935. **2**: p. 13-24.
43. Costes, S.V., A. Boissiere, S. Ravani, R. Romano, B. Parvin, and M.H. Barcellos-Hoff, *Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts*. Radiat Res, 2006. **165**(5): p. 505-15.
44. Courdi, A., D. Mari, J. Herault, and P. Chauvel, *Micronucleus induction and reproductive death in a human cell line exposed to low-energy argon beam*. Radiat Environ Biophys, 1995. **34**(2): p. 85-9.
45. Cox, A.G. and M.B. Hampton, *Bcl-2 over-expression promotes genomic instability by inhibiting apoptosis of cells exposed to hydrogen peroxide*. Carcinogenesis, 2007. **28**(10): p. 2166-71.
46. Cremer, M., K. Kupper, B. Wagler, L. Wizelman, J. von Hase, Y. Weiland, L. Kreja, J. Diebold, M.R. Speicher, and T. Cremer, *Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 809-20.
47. Cui, J., G. Zhang, C. Hao, Y. Wang, Y. Lou, W. Zhang, J. Wang, and S. Liu, *The expression of TIPE1 in murine tissues and human cell lines*. Mol Immunol, 2011. **48**(12-13): p. 1548-55.
48. Dahl, C. and J. Dahl, In: Yeagle PL, editor. *Biology of cholesterol*, ed. Y. PL. 1988, Boca Raton: CRC Press. p. 147-172.
49. Dallas, P.B., N.G. Gottardo, M.J. Firth, A.H. Beesley, K. Hoffmann, P.A. Terry, J.R. Freitas, J.M. Boag, A.J. Cummings, and U.R. Kees, *Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?* BMC Genomics, 2005. **6**: p. 59.
50. Damaraju, S., D. Murray, J. Dufour, D. Carandang, S. Myrehaug, G. Fallone, C. Field, R. Greiner, J. Hanson, C.E. Cass, and M. Parliament, *Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2545-54.
51. Danielsson, A., K. Claesson, T.Z. Parris, K. Helou, S. Nemes, K. Elmroth, J. Elgqvist, H. Jensen, and R. Hultborn, *Differential gene expression in human fibroblasts after alpha-particle emitter (211)At compared with (60)Co irradiation*. Int J Radiat Biol, 2013. **89**(4): p. 250-8.
52. Daskalow, K., P. Boisguerin, B. Jandrig, F.K. Van Landeghem, R. Volkmer, B. Micheel, and J.A. Schenk, *Generation of an antibody against the protein phosphatase 1 inhibitor KEPI and characterization of the epitope*. Anticancer Res, 2010. **30**(5): p. 1573-8.

53. Datta, K., D.R. Hyduke, S. Suman, B.H. Moon, M.D. Johnson, and A.J. Fornace, Jr., *Exposure to ionizing radiation induced persistent gene expression changes in mouse mammary gland*. Radiat Oncol, 2012. **7**: p. 205.
54. Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo, and M. Lobrich, *Chromosome breakage after G2 checkpoint release*. J Cell Biol, 2007. **176**(6): p. 749-55.
55. Deng, J., K.H. Schoenbach, E.S. Buescher, P.S. Hair, P.M. Fox, and S.J. Beebe, *The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells*. Biophys J, 2003. **84**(4): p. 2709-14.
56. Desai, N., E. Davis, P. O'Neill, M. Durante, F.A. Cucinotta, and H. Wu, *Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE-particle radiation*. Radiat Res, 2005. **164**(4 Pt 2): p. 518-22.
57. Di Pietro, R., L. Centurione, N. Sabatini, D. Bosco, S. Sancilio, F. Garaci, R. Rana, and A. Cataldi, *Caspase-3 is dually regulated by apoptogenic factors mitochondrial release and by SAPK/JNK metabolic pathway in leukemic cells exposed to etoposide-ionizing radiation combined treatment*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2004. **17**(2): p. 181-90.
58. Ding, L.H., S. Park, M. Peyton, L. Girard, Y. Xie, J.D. Minna, and M.D. Story, *Distinct transcriptome profiles identified in normal human bronchial epithelial cells after exposure to gamma-rays and different elemental particles of high Z and energy*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 372.
59. Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D.H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas, and C. Lukas, *RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins*. Cell, 2009. **136**(3): p. 435-46.
60. DSMZ, *Factsheet "Jurkat"*, DSMZ No.: ACC 282 2009.
61. Elmroth, K. and B. Stenerlow, *DNA-incorporated 125I induces more than one double-strand break per decay in mammalian cells*. Radiat Res, 2005. **163**(4): p. 369-73.
62. Evans, H.H., M. Ricanati, M.F. Horng, Q.Y. Jiang, J. Mencl, and P. Olive, *DNA Double-Strand Break Rejoining Deficiency in Tk6 and Other Human B-Lymphoblast Cell-Lines*. Radiation Research, 1993. **134**(3): p. 307-315.
63. Fei, P. and W.S. El-Deiry, *P53 and radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5774-83.
64. Feinendegen, L., K. Hahn, H. Löcker, H. Müller, H.G. Paretzke, C. Reiners, W. Rühm, R. Schneider, and C. Zach, *Radioaktivität, Röntgenstrahlung und Gesundheit*. Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz 2006. **Buch**.
65. Fenech, M. and A. Morley, *Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay*. Cytobios, 1985. **43**(172-173): p. 233-46.
66. Forrester, H.B. and C.N. Sprung, *Intragenic controls utilizing radiation-induced alternative transcript regions improves gene expression biodosimetry*. Radiation research, 2014. **181**(3): p. 314-323.
67. Franken, N.A., R. ten Cate, P.M. Krawczyk, J. Stap, J. Haveman, J. Aten, and G.W. Barendsen, *Comparison of RBE values of high-LET alpha-particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 64.
68. Giesen, U., *persönliche Mitteilung*. Physikalisch-Technische Bundesanstalt Braunschweig, Germany, 2010.
69. Goodhead, D.T., *The Initial Physical Damage Produced by Ionizing-Radiations*. International Journal of Radiation Biology, 1989. **56**(5): p. 623-634.
70. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
71. Green, D.R. and J.E. Chipuk, *p53 and metabolism: Inside the TIGAR*. Cell, 2006. **126**(1): p. 30-2.

72. Greif, K.D., H.J. Brede, D. Frankenberg, and U. Giesen, *The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells*. Nuclear Instruments and Methods B, 2004. **217**(3): p. 505-512.
73. Groesser, T., E. Chun, and B. Rydberg, *Relative biological effectiveness of high-energy iron ions for micronucleus formation at low doses*. Radiation Research, 2007. **168**(6): p. 675-682.
74. Guttmann, D.M. and C. Koumenis, *The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer*. Cancer Biology & Therapy, 2011. **12**(12): p. 1023-1031.
75. Ha, J.Y., J.S. Kim, Y.H. Kang, E. Bok, Y.S. Kim, and J.H. Son, *Tnfrsf11/Oxi-beta binds to FBXW5, increasing autophagy through activation of TSC2 in a Parkinson's disease model*. J Neurochem, 2014.
76. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. J Radiat Res (Tokyo), 2008. **49**(3): p. 203-10.
77. Haimovitz-Friedman, A., C.C. Kan, D. Ehleiter, R.S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks, and R.N. Kolesnick, *Ionizing-Radiation Acts on Cellular Membranes to Generate Ceramide and Initiate Apoptosis*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**(2): p. 525-535.
78. Hall, E.J., *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
79. Hallahan, D.E., V.P. Sukhatme, M.L. Sherman, S. Virudachalam, D. Kufe, and R.R. Weichselbaum, *Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2156-60.
80. Heddle, J.A., *A rapid in vivo test for chromosomal damage*. Mutat Res, 1973. **18**(2): p. 187-90.
81. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
82. Hitomi, J.I., D.E. Christofferson, A. Ng, J.H. Yao, A. Degterev, R.J. Xavier, and J.Y. Yuan, *Identification of a Molecular Signaling Network that Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1311-1323.
83. Hofmann, W., H. Fakir, I. Aubineau-Laniece, and P. Pihet, *Interaction of alpha particles at the cellular level - Implications for the radiation weighting factor*. Radiation Protection Dosimetry, 2004. **112**(4): p. 493-500.
84. Holmberg, K., A.E. Meijer, M. Harms-Ringdahl, and B. Lambert, *Chromosomal instability in human lymphocytes after low dose rate gamma-irradiation and delayed mitogen stimulation*. Int J Radiat Biol, 1998. **73**(1): p. 21-34.
85. Howell, R.W., D.V. Rao, D.Y. Hou, V.R. Narra, and K.S. Sastry, *The question of relative biological effectiveness and quality factor for auger emitters incorporated into proliferating mammalian cells*. Radiat Res, 1991. **128**(3): p. 282-92.
86. Howell, R.W., *Radiation Spectra for Auger-Electron Emitting Radionuclides - Report No 2 of Aapm-Nuclear-Medicine-Task-Group No 6*. Medical Physics, 1992. **19**(6): p. 1371-1383.
87. Howell, R.W., *Auger processes in the 21st century*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(12): p. 959-75.
88. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
89. Humm, J.L., *The analysis of auger electrons released following the decay of radioisotopes and photoelectric interactions and their contribution to energy deposition*. Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Nr. 1932, 1984.
90. Ibanez, I.L., C. Bracalente, B.L. Molinari, M.A. Palmieri, L. Policastro, A.J. Kreiner, A.A. Burlon, A. Valda, D. Navalesi, J. Davidson, M. Davidson, M. Vazquez, M. Ozafran, and H. Duran, *Induction and Rejoining of DNA Double Strand Breaks Assessed by H2ax Phosphorylation in Melanoma Cells Irradiated with Proton and Lithium Beams*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2009. **74**(4): p. 1226-1235.

91. ICRP, *Recommendations of the International Commission on Radiological Protection (ICRP)*. ICRP publication 103, 2007. **Ann ICRP** **37(2-4)**: p. 1-332.
92. Iliakis, G., G.E. Pantelias, R. Okayasu, and R. Seamer, *125I<sub>Urd</sub>-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in G1-phase CHO-cells*. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1987. **52(5)**: p. 705-22.
93. Iliakis, G.E. and R. Okayasu, *Radiosensitivity Throughout the Cell-Cycle and Repair of Potentially Lethal Damage and DNA Double-Strand Breaks in an X-Ray-Sensitive Cho Mutant*. *International Journal of Radiation Biology*, 1990. **57(6)**: p. 1195-1211.
94. Imai, Y., M. Kurokawa, K. Izutsu, A. Hangaishi, K. Maki, S. Ogawa, S. Chiba, K. Mitani, and H. Hirai, *Mutations of the Smad4 gene in acute myelogeneous leukemia and their functional implications in leukemogenesis*. *Oncogene*, 2001. **20(1)**: p. 88-96.
95. Ionescu, M., M. Ciocirlan, C. Ionescu, G. Becheanu, S. Gologan, A. Teiusanu, T. Arbanas, and D. Mircea, *Genetic biomarkers for neoplastic colorectal cancer in peripheral lymphocytes*. *Maedica (Buchar)*, 2011. **6(2)**: p. 83-9.
96. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. *Carcinogenesis*, 2002. **23(5)**: p. 687-96.
97. Jen, K.Y. and V.G. Cheung, *Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation*. *Genome Res*, 2003. **13(9)**: p. 2092-100.
98. Jen, K.Y. and V.G. Cheung, *Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response*. *Cancer Res*, 2005. **65(17)**: p. 7666-73.
99. Jenner, T.J., C.M. Delara, P. Oneill, and D.L. Stevens, *Induction and Rejoining of DNA Double-Strand Breaks in V79-4 Mammalian-Cells Following Gamma-Irradiation and Alpha-Irradiation*. *International Journal of Radiation Biology*, 1993. **64(3)**: p. 265-273.
100. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28(1)**: p. 27-30.
101. Kantari, C. and H. Walczak, *Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813(4)**: p. 558-63.
102. Karlsson, K.H. and B. Stenerlow, *Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions*. *Radiation Research*, 2004. **161(5)**: p. 517-527.
103. Kaspler, P., O. Hyrien, and R.P. Hill, *Dynamics of micronuclei in mouse skin fibroblasts after gamma irradiation*. *Health Phys*, 2010. **98(2)**: p. 228-33.
104. Kassis, A.I., K.S. Sastry, and S.J. Adelstein, *Kinetics of uptake, retention, and radiotoxicity of 125I<sub>UdR</sub> in mammalian cells: implications of localized energy deposition by Auger processes*. *Radiat Res*, 1987. **109(1)**: p. 78-89.
105. Kassis, A.I., *The amazing world of auger electrons*. *International Journal of Radiation Biology*, 2004. **80(11-12)**: p. 789-803.
106. Kassis, A.I. and S.J. Adelstein, *Radiobiologic principles in radionuclide therapy*. *J Nucl Med*, 2005. **46 Suppl 1**: p. 4S-12S.
107. Kataoka, Y., V.P. Bindokas, R.C. Duggan, J.S. Murley, and D.J. Grdina, *Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2006. **47(3-4)**: p. 245-57.
108. Katiyar, S.K., M.S. Matsui, and H. Mukhtar, *Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1*. *J Invest Dermatol*, 2000. **114(2)**: p. 328-33.
109. Keebaugh, A.C., H.A. Mitchell, M. Gaval-Cruz, K.G. Freeman, G.L. Edwards, D. Weinshenker, and J.W. Thomas, *PRTFDC1 Is a Genetic Modifier of HPRT-Deficiency in the Mouse*. *Plos One*, 2011. **6(7)**.
110. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26(4)**: p. 239-57.
111. Kim, R.O., J.S. Rhee, E.J. Won, K.W. Lee, C.M. Kang, Y.M. Lee, and J.S. Lee, *Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, Brachionus sp.* *Aquat Toxicol*, 2011. **101(3-4)**: p. 529-39.



112. Kirshner, J., M.F. Jobling, M.J. Pajares, S.A. Ravani, A.B. Glick, M.J. Lavin, S. Koslov, Y. Shiloh, and M.H. Barcellos-Hoff, *Inhibition of transforming growth factor-beta1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10861-9.
113. Knops, K., *Genexpressionsanalysen in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Bestrahlung - Grundlagen für biodosimetrische Applikationen*. Dissertation, 2012.
114. Knops, K., S. Boldt, O. Wolkenhauer, and R. Kriehuber, *Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry*. Radiat Res, 2012. **178**(4): p. 304-12.
115. Koarada, S. and Y. Tada, *RP105-negative B cells in systemic lupus erythematosus*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 259186.
116. Kornberg, R.D. and J.O. Thomas, *Chromatin structure; oligomers of the histones*. Science, 1974. **184**(4139): p. 865-8.
117. Krieger, H., *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 2012. **Buch 4. Auflage**.
118. Kriehuber, R., M. Riedling, M. Simko, and D.G. Weiss, *Cytotoxicity, genotoxicity and intracellular distribution of the Auger electron emitter (65)Zn in two human cell lines*. Radiat Environ Biophys, 2004. **43**(1): p. 15-22.
119. Kroczyńska, B., L. King-Simmons, L. Alloza, M.A. Alava, E.C. Elguindi, and S.Y. Blond, *BIP co-chaperone MTJ1/ERDJ1 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(3): p. 1467-77.
120. Kummerle, E.A. and E. Pomplun, *Charge build-up during decay of DNA-incorporated (123/125)I: consequences for labeled molecular structures*. Int J Radiat Biol, 2012. **88**(12): p. 922-7.
121. Kurpinski, K., D.J. Jang, S. Bhattacharya, B. Rydberg, J. Chu, J. So, A. Wyrobek, S. Li, and D. Wang, *Differential effects of x-rays and high-energy 56Fe ions on human mesenchymal stem cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **73**(3): p. 869-77.
122. Leatherbarrow, E.L., J.V. Harper, F.A. Cucinotta, and P. O'Neill, *Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation*. International Journal of Radiation Biology, 2006. **82**(2): p. 111-118.
123. Liu, F., W.P. Kuo, T.K. Jenssen, and E. Hovig, *Performance comparison of multiple microarray platforms for gene expression profiling*. Methods Mol Biol, 2012. **802**: p. 141-55.
124. Liu, M.C. and E.P. Gelmann. *P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors*. in *Seminars in oncology*. 2002. Elsevier.
125. Liu, Q.R., P.W. Zhang, Q. Zhen, D. Walther, X.B. Wang, and G.R. Uhl, *KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 13312-20.
126. Lobrich, M., A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A.A. Goodarzi, O. Barton, and P.A. Jeggo, *gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization*. Cell Cycle, 2010. **9**(4): p. 662-9.
127. Loppnow, H., *[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]*. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
128. Lu-Hesselmann, J., M. Abend, and D. van Beuningen, *Comparison of endogenous TP53 genomic status with clonogenicity and different modes of cell death after X irradiation*. Radiation Research, 2004. **161**(1): p. 39-47.
129. Lu, T.P., L.C. Lai, B.I. Lin, L.H. Chen, T.H. Hsiao, H.L. Liber, J.A. Cook, J.B. Mitchell, M.H. Tsai, and E.Y. Chuang, *Distinct signaling pathways after higher or lower doses of radiation in three closely related human lymphoblast cell lines*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **76**(1): p. 212-9.
130. Luckehuhle, C., E.A. Blakely, P.Y. Chang, and C.A. Tobias, *Drastic G2 Arrest in Mammalian-Cells after Irradiation with Heavy-Ion Beams*. Radiation Research, 1979. **79**(1): p. 97-112.

131. MacPhail, S.H., J.P. Banath, T.Y. Yu, E.H. Chu, H. Lambur, and P.L. Olive, *Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays*. International Journal of Radiation Biology, 2003. **79**(5): p. 351-8.
132. MacPhail, S.H., J.P. Banath, Y. Yu, E. Chu, and P.L. Olive, *Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells*. Radiat Res, 2003. **159**(6): p. 759-67.
133. Makrigiorgos, G.M., A.I. Kassis, J. Baranowska-Kortylewicz, K.D. McElvany, M.J. Welch, K.S. Sastry, and S.J. Adelstein, *Radiotoxicity of 5-[123I]iodo-2'-deoxyuridine in V79 cells: a comparison with 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine*. Radiat Res, 1989. **118**(3): p. 532-44.
134. Makrigiorgos, G.M., R.M. Berman, J. Baranowska-Kortylewicz, E. Bump, J.L. Humm, S.J. Adelstein, and A.I. Kassis, *DNA damage produced in V79 cells by DNA-incorporated iodine-123: a comparison with iodine-125*. Radiat Res, 1992. **129**(3): p. 309-14.
135. Markova, E., N. Schultz, and I.Y. Belyaev, *Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival*. International Journal of Radiation Biology, 2007. **83**(5): p. 319-329.
136. Meador, J.A., S.A. Ghandhi, and S.A. Amundson, *p53-Independent Downregulation of Histone Gene Expression in Human Cell Lines by High- and Low-LET Radiation*. Radiation Research, 2011. **175**(6): p. 689-699.
137. Meijer, A.E., U.S.E. Kronqvist, R. Lewensohn, and M. Harms-Ringdahl, *RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions*. International Journal of Radiation Biology, 1998. **73**(2): p. 169-177.
138. Mezentshev, A. and S.A. Amundson, *Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model*. Radiat Res, 2011. **175**(6): p. 677-88.
139. Mikkelsen, R.B. and P. Wardman, *Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5734-54.
140. Misra, U.K., M. Gonzalez-Gronow, G. Gawdi, and S.V. Pizzo, *The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2092-7.
141. Mitchison, N.A. and L.R. Wedderburn, *B cells in autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8750-1.
142. Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1799-805.
143. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
144. Morgenroth, A., C. Dinger, B.D. Zlatopolskiy, E. Al-Momani, G. Glatting, F.M. Mottaghy, and S.N. Reske, *Auger electron emitter against multiple myeloma-targeted endo-radio-therapy with 125I-labeled thymidine analogue 5-iodo-4'-thio-2'-deoxyuridine*. Nucl Med Biol, 2011. **38**(7): p. 1067-77.
145. Mori, E., A. Takahashi, N. Yamakawa, T. Kirita, and T. Ohnishi, *High LET heavy ion radiation induces p53-independent apoptosis*. J Radiat Res, 2009. **50**(1): p. 37-42.
146. Muller, W.U. and A. Rode, *The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5-15 Gy)*. Mutat Res, 2002. **502**(1-2): p. 47-51.
147. Mullins, D.N., E.L. Crawford, S.A. Khuder, D.A. Hernandez, Y. Yoon, and J.C. Willey, *CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma*. BMC Cancer, 2005. **5**.
148. Mutch, D.M., A. Berger, R. Mansourian, A. Rytz, and M.A. Roberts, *The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data*. BMC Bioinformatics, 2002. **3**: p. 17.

149. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-365.
150. Nakamura, H., Y. Yasui, N. Saito, A. Tachibana, K. Komatsu, and K. Ishizaki, *DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low-dose-rate radiation*. Radiation Research, 2006. **165**(3): p. 277-282.
151. Nasonova, E., S. Ritter, E. Gudowska-Nowak, and G. Kraft, *High-LET-induced chromosomal damage: time-dependent expression*. Phys Med, 2001. **17 Suppl 1**: p. 198-201.
152. Newman, H.C., K.M. Prise, M. Folkard, and B.D. Michael, *DNA double-strand break distributions in X-ray and alpha-particle irradiated V79 cells: Evidence for non-random breakage*. International Journal of Radiation Biology, 1997. **71**(4): p. 347-363.
153. Nicoletti, I., G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi, *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
154. Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka, *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
155. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid Chromatin Units (Ru Bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-332.
156. Olive, P.L. and J.P. Banath, *Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd*. Int J Radiat Biol, 1993. **64**(4): p. 349-58.
157. Olive, P.L., *The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation*. Radiat Res, 1998. **150**(5 Suppl): p. S42-51.
158. Ottolenghi, A., M. Merzagora, and H.G. Paretzke, *DNA complex lesions induced by protons and alpha-particles: track structure characteristics determining linear energy transfer and particle type dependence*. Radiat Environ Biophys, 1997. **36**(2): p. 97-103.
159. Painter, R.B., B.R. Young, and H.J. Burki, *Non-Repairable Strand Breaks Induced by I-125 Incorporated into Mammalian DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974. **71**(12): p. 4836-4838.
160. Palayoor, S.T., J.L. Humm, R.W. Atcher, J.J. Hines, and R.M. Macklis, *G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to 212Bi alpha particle irradiation*. Nucl Med Biol, 1993. **20**(6): p. 795-805.
161. Pandey, B.N., A. Kumar, P. Tiwari, and K.P. Mishra, *Radiobiological basis in management of accidental radiation exposure*. Int J Radiat Biol, 2010. **86**(8): p. 613-35.
162. Papalas, J.A., R.T. Vollmer, M. Gonzalez-Gronow, S.V. Pizzo, J. Burchette, K.E. Youens, K.B. Johnson, and M.A. Selim, *Patterns of GRP78 and MTJ1 expression in primary cutaneous malignant melanoma*. Mod Pathol, 2010. **23**(1): p. 134-43.
163. Park, E.J., D.W. Chan, J.H. Park, M.A. Oettinger, and J. Kwon, *DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(23): p. 6819-6827.
164. Passerini, A.G., C. Shi, N.M. Francesco, P. Chuan, E. Manduchi, G.R. Grant, C.J. Stoeckert, Jr., J.W. Karanian, D. Wray-Cahen, W.F. Pritchard, and P.F. Davies, *Regional determinants of arterial endothelial phenotype dominate the impact of gender or short-term exposure to a high-fat diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 142-8.
165. Paul, S. and S.A. Amundson, *Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **71**(4): p. 1236-1244.
166. Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, and W.M. Bonner, *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.
167. Piacibello, W., A. Severino, A. Stacchini, and M. Aglietta, *Differential effect of transforming growth factor beta 1 on the proliferation of human lymphoid and myeloid leukemia cells*. Haematologica, 1991. **76**(6): p. 460-6.

168. Pietsch, E.C., E. Perchiniak, A.A. Canutescu, G. Wang, R.L. Dunbrack, and M.E. Murphy, *Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 21294-304.
169. Piu, F., A. Aronheim, S. Katz, and M. Karin, *AP-1 repressor protein JDP-2: Inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(9): p. 3012-3024.
170. Pogosova-Agadjanyan, E.L., W. Fan, G.E. Georges, J.L. Schwartz, C.M. Kepler, H. Lee, A.L. Suchanek, M.R. Cronk, A. Brumbaugh, J.H. Engel, M. Yukawa, L.P. Zhao, S. Heimfeld, and D.L. Stirewalt, *Identification of radiation-induced expression changes in nonimmortalized human T cells*. Radiat Res, 2011. **175**(2): p. 172-84.
171. Pomplun, E., *123I: Calculation of the Auger Electron Spectrum and Assessment of the Strand Breakage Efficiency*. In Biophysical Aspects of Auger Processes, edited by RW Howell, V.N., KSR Sastry, DV Rao 1992: p. 121-136.
172. Pomplun, E., *123I: Calculation of the Auger Electron Spectrum and Assessment of the Strand Breakage Efficiency*. Biophysical Aspects of Auger Processes, AAPM Symposium Series No. 8, 1992: p. 121-136.
173. Pomplun, E., M. Terrissol, and R. Hille, *Ratio of complex double strand break damage induced by 125IUdR and 123IUdR correlates with experimental in vitro cell killing effectiveness*. Radiat Prot Dosimetry, 2002. **99**(1-4): p. 81-2.
174. Pomplun, E., *persönliche Mitteilung*. Forschungszentrum Jülich, Germany, 2010.
175. Pomplun, E., *Monte Carlo-simulated Auger electron spectra for nuclides of radiobiological and medical interest - a validation with noble gas ionization data*. Int J Radiat Biol, 2012. **88**(1-2): p. 108-14.
176. Price, B.D. and A.D. D'Andrea, *Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1344-1354.
177. Prise, K.M., M. Folkard, H.C. Newman, and B.D. Michael, *Effect of radiation quality on lesion complexity in cellular DNA*. International Journal of Radiation Biology, 1994. **66**(5): p. 537-42.
178. Prise, K.M., M. Pinto, H.C. Newman, and B.D. Michael, *A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering*. Radiat Res, 2001. **156**(5 Pt 2): p. 572-6.
179. Rao, D.V., V.R. Narra, R.W. Howell, G.F. Govelitz, and K.S. Sastry, *In-vivo radiotoxicity of DNA-incorporated 125I compared with that of densely ionising alpha-particles*. Lancet, 1989. **2**(8664): p. 650-3.
180. Reed, J.C., *Dysregulation of apoptosis in cancer*. Journal of Clinical Oncology, 1999. **17**(9): p. 2941-2941.
181. Reinhardt, H.C. and B. Schumacher, *The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer*. Trends Genet, 2012. **28**(3): p. 128-36.
182. Reiser, M., F.-P. Kuhn, and J. Debus, *Duale Reihe Radiologie: Teil A, Kapitel 1: Physikalische Grundlagen*. 2. Auflage. 2006, Stuttgart.
183. Reits, E.A., J.W. Hodge, C.A. Herberts, T.A. Groothuis, M. Chakraborty, E.K. Wansley, K. Camphausen, R.M. Luiten, A.H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F.A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J.J. Neefjes, *Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1259-71.
184. Reske, S.N., S. Deisenhofer, G. Glatting, B.D. Zlatopolskiy, A. Morgenroth, A.T. Vogg, A.K. Buck, and C. Friesen, *123I-ITdU-mediated nanoirradiation of DNA efficiently induces cell kill in HL60 leukemia cells and in doxorubicin-, beta-, or gamma-radiation-resistant cell lines*. J Nucl Med, 2007. **48**(6): p. 1000-7.
185. Ribeiro, A., S.F. Bronk, P.J. Roberts, R. Urrutia, and G.J. Gores, *The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor, TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1490-1497.
186. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 897-907.

187. Rieger, K.E. and G. Chu, *Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(16): p. 4786-803.
188. Ritter, S. and M. Durante, *Heavy-ion induced chromosomal aberrations: A review*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **701**(1): p. 38-46.
189. Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner, *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
190. Rogakou, E.P., C. Boon, C. Redon, and W.M. Bonner, *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 905-16.
191. Rogakou, E.P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier, and W.M. Bonner, *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9390-5.
192. Rosenbluth, M.J., W.A. Lam, and D.A. Fletcher, *Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability*. Biophys J, 2006. **90**(8): p. 2994-3003.
193. Rothkamm, K. and M. Lobrich, *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5057-62.
194. Rothkamm, K., C. Beinke, H. Romm, C. Badie, Y. Balagurunathan, S. Barnard, N. Bernard, H. Boulay-Greene, M. Brengues, A. De Amicis, S. De Sanctis, R. Greither, F. Herodin, A. Jones, S. Kabacik, T. Knie, U. Kulka, F. Lista, P. Martigne, A. Missel, J. Moquet, U. Oestreicher, A. Peinnequin, T. Poyot, U. Roessler, H. Scherthan, B. Terbrueggen, H. Thierens, M. Valente, A. Vral, F. Zenhausem, V. Meineke, H. Braselmann, and M. Abend, *Comparison of established and emerging biodosimetry assays*. Radiat Res, 2013. **180**(2): p. 111-9.
195. Rubin, D.B., E.A. Drab, and K.D. Bauer, *Endothelial cell subpopulations in vitro: cell volume, cell cycle, and radiosensitivity*. J Appl Physiol (1985), 1989. **67**(4): p. 1585-90.
196. Russ, J. and M.E. Futschik, *Comparison and consolidation of microarray data sets of human tissue expression*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 305.
197. Ryter, S.W., H.P. Kim, A. Hoetzel, J.W. Park, K. Nakahira, X. Wang, and A.M. Choi, *Mechanisms of cell death in oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(1): p. 49-89.
198. Sadeghi, M., M. Enferadi, and A. Shirazi, *External and internal radiation therapy: Past and future directions*. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2010. **6**(3): p. 239-248.
199. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
200. Savli, H., D. Sunnetci, N. Cine, D.F. Gluzman, M.P. Zavelevich, L.M. Sklyarenko, V.A. Nadgornaya, and S.V. Koval, *Gene expression profiling of B-CLL in Ukrainian patients in post-Chernobyl period*. Exp Oncol, 2012. **34**(1): p. 57-63.
201. Schaich, K.M., *Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation--Part I: ionizing radiation*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1980. **13**(2): p. 89-129.
202. Schiffmann, D. and U. De Boni, *Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise*. Mutat Res, 1991. **246**(1): p. 113-22.
203. Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. Int J Cancer, 1977. **19**(5): p. 621-6.
204. Scholz, M., W. Kraftweyrather, S. Ritter, and G. Kraft, *Cell-Cycle Delays Induced by Heavy-Ion Irradiation of Synchronous Mammalian-Cells*. International Journal of Radiation Biology, 1994. **66**(1): p. 59-75.

205. Sedelnikova, O.A., E.P. Rogakou, I.G. Panyutin, and W.M. Bonner, *Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody*. Radiat Res, 2002. **158**(4): p. 486-92.
206. Seideman, J.H., B. Stancevic, J.A. Rotolo, M.R. McDevitt, R.W. Howell, R.N. Kolesnick, and D.A. Scheinberg, *Alpha Particles Induce Apoptosis through the Sphingomyelin Pathway*. Radiation Research, 2011. **176**(4): p. 434-446.
207. Shannon, C.P., Z. Hollander, J. Wilson-McManus, R. Balshaw, R.T. Ng, R. McMaster, B.M. McManus, P.A. Keown, and S.J. Tebbutt, *White blood cell differentials enrich whole blood expression data in the context of acute cardiac allograft rejection*. Bioinform Biol Insights, 2012. **6**: p. 49-61.
208. Sijts, E.J. and P.M. Kloetzel, *The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1491-502.
209. Sokolov, M., I.G. Panyutin, and R. Neumann, *Genome-wide gene expression changes in normal human fibroblasts in response to low-let gamma-radiation and high-let-like (125)IUdR exposures*. Radiation Protection Dosimetry, 2006. **122**(1-4): p. 195-201.
210. Sokolov, M.V., N.A. Smimova, R.D. Camerini-Otero, R.D. Neumann, and I.G. Panyutin, *Microarray analysis of differentially expressed genes after exposure of normal human fibroblasts to ionizing radiation from an external source and from DNA-incorporated iodine-125 radionuclide*. Gene, 2006. **382**: p. 47-56.
211. Sokolov, M.V., R.D. Neumann, and I.G. Panyutin, *Effects of DNA-targeted ionizing radiation produced by 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine on global gene expression in primary human cells*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 192.
212. Spittau, B. and K. Krieglstein, *Klf10 and Klf11 as mediators of TGF-beta superfamily signaling*. Cell and Tissue Research, 2012. **347**(1): p. 65-72.
213. Sprung, C.N., J. Li, D. Hovan, M.J. McKay, and H.B. Forrester, *Alternative transcript initiation and splicing as a response to DNA damage*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25758.
214. Stap, J., P.M. Krawczyk, C.H. Van Oven, G.W. Barendsen, J. Essers, R. Kanaar, and J.A. Aten, *Induction of linear tracks of DNA double-strand breaks by alpha-particle irradiation of cells*. Nature Methods, 2008. **5**(3): p. 261-266.
215. Stenerlow, B., E. Hoglund, J. Carlsson, and E. Blomquist, *Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer*. International Journal of Radiation Biology, 2000. **76**(4): p. 549-557.
216. Stewart, G.S., B. Wang, C.R. Bignell, A.M.R. Taylor, and S.J. Elledge, *MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint*. Nature, 2003. **421**(6926): p. 961-966.
217. Stopper, H. and S.O. Muller, *Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview*. Toxicology in Vitro, 1997. **11**(5): p. 661-667.
218. Su, C., G. Gao, S. Schneider, C. Helt, C. Weiss, M.A. O'Reilly, D. Bohmann, and J. Zhao, *DNA damage induces downregulation of histone gene expression through the G1 checkpoint pathway*. EMBO J, 2004. **23**(5): p. 1133-43.
219. Subramaniam, M., J.R. Hawse, N.M. Rajamannan, J.N. Ingle, and T.C. Spelsberg, *Functional role of KLF10 in multiple disease processes*. Biofactors, 2010. **36**(1): p. 8-18.
220. Suzuki, E., I. Imoto, A. Pimkhaokham, T. Nakagawa, N. Kamata, K. Kozaki, T. Amagasa, and J. Inazawa, *PRTFDC1, a possible tumor-suppressor gene, is frequently silenced in oral squamous-cell carcinomas by aberrant promoter hypermethylation*. Oncogene, 2007. **26**(57): p. 7921-7932.
221. Takahashi, A., N. Yamakawa, T. Kirita, K. Omori, N. Ishioka, Y. Furusawa, E. Mori, K. Ohnishi, and T. Ohnishi, *DNA Damage Recognition Proteins Localize along Heavy Ion Induced Tracks in the Cell Nucleus*. Journal of Radiation Research, 2008. **49**(6): p. 645-652.
222. Thompson, L.H., A.V. Carrano, K. Sato, E.P. Salazar, B.F. White, S.A. Stewart, J.L. Minkler, and M.J. Siciliano, *Identification of nucleotide-excision-repair genes on human chromosomes 2 and 13 by functional complementation in hamster-human hybrids*. Somat Cell Mol Genet, 1987. **13**(5): p. 539-51.

223. Todd, D.G. and R.B. Mikkelsen, *Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] in human epithelial tumor cells*. *Cancer Res*, 1994. **54**(19): p. 5224-30.
224. Tomita, M., *Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2010. **51**(5): p. 493-501.
225. Torrents, D., M. Suyama, E. Zdobnov, and P. Bork, *A genome-wide survey of human pseudogenes*. *Genome Res*, 2003. **13**(12): p. 2559-67.
226. Tozeren, A., K.L. Sung, L.A. Sung, M.L. Dustin, P.Y. Chan, T.A. Springer, and S. Chien, *Micromanipulation of adhesion of a Jurkat cell to a planar bilayer membrane containing lymphocyte function-associated antigen 3 molecules*. *J Cell Biol*, 1992. **116**(4): p. 997-1006.
227. Tucker, J.D., M.C. Joiner, R.A. Thomas, W.E. Grever, M.V. Bakhmutsky, C.N. Chinkhota, J.M. Smolinski, G.W. Divine, and G.W. Auner, *Accurate Gene Expression-Based Biodosimetry Using a Minimal Set of Human Gene Transcripts*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2014. **88**(4): p. 933-939.
228. Udono, H., T. Ichiyanagi, S. Mizukami, and T. Imai, *Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells*. *Int J Hyperthermia*, 2009. **25**(8): p. 617-25.
229. Valentin, J., *Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (w<sub>R</sub>)* *Annals of the ICRP*, 2003. **33**(4): p. 1-121.
230. Van Holde, K.E., J.R. Allen, K. Tatchell, W.O. Weischet, and D. Lohr, *DNA-histone interactions in nucleosomes*. *Biophys J*, 1980. **32**(1): p. 271-82.
231. Vandenbulcke, K., F. De Vos, F. Offner, J. Philippe, C. Apostolidis, R. Molinet, T.K. Nikula, K. Bacher, V. de Gelder, A. Vral, C. Lahorte, H. Thierens, R.A. Dierckx, and G. Slegers, *In vitro evaluation of 213Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003. **30**(10): p. 1357-64.
232. Varma, S., Y. Pommier, M. Sunshine, J.N. Weinstein, and W.C. Reinhold, *High resolution copy number variation data in the NCI-60 cancer cell lines from whole genome microarrays accessible through CellMiner*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92047.
233. Vispe, S. and M.S. Satoh, *DNA repair patch-mediated double strand DNA break formation in human cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(35): p. 27386-27392.
234. Vral, A., H. Thierens, and L. De Ridder, *Study of dose-rate and split-dose effects on the in vitro micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays*. *Int J Radiat Biol*, 1992. **61**(6): p. 777-84.
235. Vral, A., M. Fenech, and H. Thierens, *The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure*. *Mutagenesis*, 2011. **26**(1): p. 11-17.
236. Wang, B., S. Matsuoka, B.A. Ballif, D. Zhang, A. Smogorzewska, S.P. Gygi, and S.J. Elledge, *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1194-1198.
237. Wang, M., J. Saha, M. Hada, J.A. Anderson, J.M. Pluth, P. O'Neill, and F.A. Cucinotta, *Novel Smad proteins localize to IR-induced double-strand breaks: interplay between TGFβ and ATM pathways*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(2): p. 933-42.
238. Ward, I.M. and J.J. Chen, *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(51): p. 47759-47762.
239. Ward, I.M., K. Minn, K.G. Jorda, and J.J. Chen, *Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(22): p. 19579-19582.
240. Wehner, R. and W.J. Gehring, *Zoologie*. Vol. 25. 2013: Thieme.

241. Weis, B., *Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms*. Nature methods, 2005. **2**(5): p. 351-356.
242. Welin, M., L. Egeblad, A. Johansson, P. Stenmark, L. Wang, S. Flodin, T. Nyman, L. Tresaugues, T. Kotenyova, I. Johansson, S. Eriksson, H. Eklund, and P. Nordlund, *Structural and functional studies of the human phosphoribosyltransferase domain containing protein 1*. FEBS J, 2010. **277**(23): p. 4920-30.
243. Whalen, M.K., S.K. Gurai, H. Zahed-Kargaran, and J.M. Pluth, *Specific ATM-mediated phosphorylation dependent on radiation quality*. Radiat Res, 2008. **170**(3): p. 353-64.
244. Wheeler, A.R., W.R. Thronset, R.J. Whelan, A.M. Leach, R.N. Zare, Y.H. Liao, K. Farrell, I.D. Manger, and A. Daridon, *Microfluidic device for single-cell analysis*. Anal Chem, 2003. **75**(14): p. 3581-6.
245. Wu, W., M. Wang, S.K. Singh, T. Mussfeldt, and G. Iliakis, *Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(2): p. 329-38.
246. Wu, X. and Y. Deng, *Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d151-6.
247. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
248. Yamada, Y., Y. Oghiso, H. Enomoto, and N. Ishigure, *Induction of micronuclei in a rat alveolar epithelial cell line by alpha particle irradiation*. Radiat Prot Dosimetry, 2002. **99**(1-4): p. 219-22.
249. Yasui, L., A. Hughes, and E. DeSombre, *Relative biological effectiveness of accumulated 125IdU and 125I-estrogen decays in estrogen receptor-expressing MCF-7 human breast cancer cells*. Radiat Res, 2001. **155**(2): p. 328-34.
250. Yasui, L.S., A. Hughes, and E.R. DeSombre, *Production of clustered DNA damage by 125I decay*. Acta Oncol, 2000. **39**(6): p. 739-40.
251. Yasui, L.S., *GammaH2AX foci induced by gamma rays and 125idU decay*. Int J Radiat Biol, 2004. **80**(11-12): p. 895-903.
252. Yauk, C.L. and M.L. Berndt, *Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2007. **48**(5): p. 380-394.
253. Yikrazuul, *5-Iodo-2'-deoxyuridine*. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Idoxuridine\\_-\\_Idoxuridin.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Idoxuridine_-_Idoxuridin.svg), 2014(2. Version vom 14. Juni 2014).
254. Zhang, Y., J.S. Wang, L.L. Chen, Y. Zhang, X.K. Cheng, F.Y. Heng, N.H. Wu, and Y.F. Shen, *Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42545-51.
255. Zhang, Z., P.M. Harrison, Y. Liu, and M. Gerstein, *Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome*. Genome Res, 2003. **13**(12): p. 2541-58.
256. Zhao, J., *Coordination of DNA synthesis and histone gene expression during normal cell cycle progression and after DNA damage*. Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 695-7.
257. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
258. Zhu, Q., L. Lin, Q. Cheng, Q. Xu, J. Zhang, S. Tomlinson, J. Jin, X. Chen, and S. He, *The role of acid sphingomyelinase and caspase 5 in hypoxia-induced HuR cleavage and subsequent apoptosis in hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(12): p. 1453-61.
259. Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang, *An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.



## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema des Auger-Effekts in Folge eines photoelektrischen Effekts. ....	3
Abb. 2: Strukturformel von $^{123}\text{I}$ -Iododeoxyuridin (a; modifiziert von Yikrazuul [253]) und Zerfallsschema von $^{123}\text{I}$ (b; von Pomplun [172]). ....	4
Abb. 3: Schematische Darstellung der räumlichen Verteilung der Energiedeposition von $\gamma$ - Strahlung (a), $\alpha$ -Strahlung (b) und eines DNA-assoziierten AEE (c) in Bezug auf eine Zelle inkl. Zellkern (a-c) bzw. auf die DNA (d; modifiziert von Sadeghi <i>et al.</i> [198]). ....	6
Abb. 4: Darstellung einer binukleären Zelle mit Mikrokern. ....	13
Abb. 5: Aufnahmekinetik von $^{125}\text{IdU}$ . ....	31
Abb. 6: Energiedeposition und Dosis nach Zerfall von gleichverteilten $^{123}\text{I}$ -Nukliden in Abhängigkeit vom Durchmesser des Targets (modifiziert von Pomplun [174]). ....	32
Abb. 7: Exemplarisches Agarosegel zur Überprüfung der Spezifität der Primer. ....	44
Abb. 8: DNA-Aufnahme von $^{123}\text{IdU}$ in Jurkat-Zellen. ....	47
Abb. 9: Volumenbestimmung von Jurkat-Zelle und deren Zellkern. ....	48
Abb. 10: Zelluläre Aufnahme von $^{123}\text{IdU}$ sowohl mit als auch ohne EdU. ....	49
Abb. 11: Repräsentative DNA-kombinierte EdU <i>Dotplots</i> von Jurkat-Zellen nach Co-Labeling mit $^{123}\text{IdU}$ /EdU. ....	50
Abb. 12: Quantifizierung der Zellzyklusverteilung von EdU-gelabelten Jurkat-Zellen nach Co- Labeling mit $^{123}\text{IdU}$ /EdU. ....	51
Abb. 13: Mikrokerninduktion in Jurkat-Zellen 24 h nach $\gamma$ -, $\alpha$ -Bestrahlung und 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. ....	52
Abb. 14: Ausbildung von $\gamma$ -H2AX Foci in Jurkat-Zellen 45 min nach $\gamma$ -Bestrahlung, $\alpha$ - Bestrahlung, 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition und $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling. ....	53
Abb. 15: Mikroskopische Quantifizierung der mittleren Anzahl von $\gamma$ -H2AX Foci pro Jurkat-Zelle 45 min nach $\gamma$ - bzw. $\alpha$ -Bestrahlung und 45 min nach $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bzw. 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. ....	54
Abb. 16: Durchflusszytometrische Quantifizierung der mittleren $\gamma$ -H2AX Signalintensität in Jurkat-Zellen 45 min nach $\gamma$ - bzw. $\alpha$ -Bestrahlung und 45 min nach $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling bzw. 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. ....	56
Abb. 17: Präsentation einer DNA-kombinierten $\gamma$ -H2AX Analyse von unbestrahlten Kontrollzellen. ....	57
Abb. 18: Repräsentative DNA-kombinierte $\gamma$ -H2AX <i>Dotplots</i> von Jurkat-Zellen 45 min nach $\gamma$ -, $\alpha$ -Bestrahlung und $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling mit stufenweise angeordneten <i>Gates</i> , die den relativen Anstieg über dem $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen zeigten. .....	58
Abb. 19: a) Prozentualer Anteil an Zellen, die den relativen Anstieg über dem $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen 45 min nach $\gamma$ -, $\alpha$ -Bestrahlung und $^{123}\text{IdU}$ - Puls-Labeling zeigten. b) Berechnete Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von $\alpha$ -Partikel-Treffern pro Zellkern [68] (siehe 2.2.5). ....	59
Abb. 20: Prozentualer Anteil an Jurkat-Zellen, die den relativen Anstieg über dem $\gamma$ -H2AX Fluoreszenz-Level der $\gamma$ -H2AX Kontrollzellen als Funktion des Zellzyklus nach 0,5 Gy $\alpha$ -, 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung und 0,24 Gy $^{123}\text{IdU}$ -Puls-Labeling zeigten. ....	60
Abb. 21: Relative Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen 24 h nach $\gamma$ -, $\alpha$ -Bestrahlung und 20- stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. ....	61
Abb. 22: Untersuchung der Chromosomenanzahl pro Jurkat-Zelle in verschiedenen Zellpassagen. .....	63
Abb. 23: Bestimmung von Äqui-Effektdosen in Jurkat-Zellen für alle drei Strahlenqualitäten anhand Apoptoseinduktion, Mikrokernbildung und mittlerer $\gamma$ -H2AX Intensität. ....	65
Abb. 24: Venn-Diagramm der signifikant regulierten Gene in Jurkat-Zellen nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten. ....	67

Abb. 25: Darstellung der signifikant regulierten biologischen Prozesse in Jurkat-Zellen 24 h nach 10 Gy $\gamma$ - und 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition. ....	68
Abb. 26: Darstellung der signifikant regulierten Signalwege in Jurkat-Zellen 24 h nach $\gamma$ - und $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.....	69
Abb. 27: Analyse der signifikant regulierten Gene bezüglich der Nukleosomenorganisation und des Systemische Lupus erythematoses Signalwegs in Jurkat-Zellen 24 h nach $\gamma$ - und $\alpha$ -Bestrahlung sowie 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition.....	72
Abb. 28: Relative Expression des Gens <i>TNFAIP8L1</i> 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 6 h nach 0,5 und 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung.....	75
Abb. 29: Relative Expression von <i>TNFAIP8L1</i> und <i>PPP1R14C</i> 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 6 h nach $\gamma$ -Bestrahlung.....	76
Abb. 30: Relative Expression von <i>DNAJC1</i> , <i>PRTFDC1</i> , <i>SMPD1</i> , <i>SNTB1</i> und <i>VWF</i> 6 h nach 20-stündiger $^{123}\text{IdU}$ -Exposition bzw. 24 h nach $\gamma$ -Bestrahlung. ....	78
Abb. 31: Relative Expression von <i>KLF10</i> und <i>FAM57B</i> 24 h nach 10 Gy $\gamma$ - bzw. 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung. ....	80
Abb. 32: Relative Expression von <i>FAM83D</i> und <i>REEP1</i> 6 h nach 10 Gy $\gamma$ - bzw. 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung. ....	81

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Primer.....	21
Tab. 2: Berechnete Wahrscheinlichkeiten der Poisson-verteilten Anzahl von $\alpha$ -Partikel Treffern pro Jurkat-Zellkern [68] (Durchmesser = 10,8 $\mu\text{m}$ ) .....	24
Tab. 3: qRT-PCR Bedingungen .....	42
Tab. 4: Signifikant regulierte Gene in Jurkat-Zellen nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten.....	66
Tab. 5: Nach Analyse der Microarray-Daten wurden mögliche Kandidatengene für die Diskriminierung der Strahlenqualitäten identifiziert und nachfolgend mit Hilfe der quantitativen RT-PCR überprüft. ....	73
Tab. 6: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse des biologischen Prozesses der Apoptoseregulation 24 h nach 10 Gy $\gamma$ - und 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung zugeordnet wurden. ....	138
Tab. 7: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Apoptose 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zugeordnet wurden. ....	138
Tab. 8: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse dem Steroidmetabolismus 24 h nach 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden. ....	139
Tab. 9: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der Transkriptionsregulation 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zugeordnet wurden.....	139
Tab. 10: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der positiven Regulation der DNA-Reparatur 24 h nach 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.....	139
Tab. 11: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der negativen Zellzyklusregulation 24 h nach 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden. ....	139
Tab. 12: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zugeordnet wurden. ....	140
Tab. 13: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Antigen-prozessierung und -präsentation 24 h nach 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden. ....	140
Tab. 14: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Steroidbiosynthese 24 h nach 10 Gy $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden. ....	140
Tab. 15: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse dem Kalziumsignalweg 24 h nach 1 Gy $\alpha$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.....	140

Apoptoseregulation		
	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)	1 Gy $\alpha$ -Strahlung (24 h)
<i>ADRB2</i>		↓
<i>ALB</i>	↑	
<i>ALX4</i>		↓
<i>AMIGO2</i>		↓
<i>APC</i>		↓
<i>API5</i>	↓	
<i>ARHGDIA</i>	↓	↓
<i>ASNS</i>	↑	↑
<i>ATF5</i>	↑	↑
<i>BBC3</i>	↑	↑
<i>BCL2A1</i>	↑	↑
<i>BCLAF1</i>	↓	
<i>BTG1</i>	↑	
<i>CARD16</i>	↑	↑
<i>CARD6</i>	↑	↓
<i>CASP1</i>		↓
<i>CASP4</i>	↑	
<i>CASP5</i>	↑	
<i>CD24</i>	↑	↑
<i>CD38</i>	↑	↑
<i>CD70</i>	↑	
<i>CEBPB</i>	↑	
<i>CEBPG</i>	↑	
<i>CREB1</i>	↓	
<i>DHCR24</i>	↓	
<i>DLX1</i>	↑	
<i>ECT2</i>	↓	
<i>ERBB2</i>	↑	
<i>ESR2</i>	↑	
<i>FOXC1</i>	↑	
<i>FOXL2</i>	↑	↑
<i>G2E3</i>	↓	
<i>HRK</i>	↑	
<i>HSP90B1</i>	↓	
<i>HSPA1A</i>	↓	
<i>HSPA5</i>	↓	↓
<i>IL4</i>	↑	↑
<i>JUN</i>	↑	
<i>KLF10</i>	↑	
<i>MCF2L</i>		↓
<i>MX1</i>	↑	
<i>NGEF</i>	↑	
<i>NTRK1</i>		↓
<i>P2RX4</i>	↑	
<i>P2RX7</i>	↑	↑
<i>PCBP4</i>	↑	
<i>PCSK6</i>	↑	
<i>PHLDA1</i>	↑	
<i>PHLDA3</i>	↑	
<i>PIM1</i>	↑	
<i>PLG</i>	↑	↑
<i>PROC</i>	↑	
<i>SELS</i>	↑	
<i>SKP2</i>	↓	
<i>SMPD1</i>	↑	
<i>SOCS2</i>	↑	
<i>SON</i>	↑	
<i>SPHK1</i>	↑	
<i>SPN</i>	↓	
<i>TAF9B</i>	↓	
<i>TIA1</i>	↓	
<i>TNFSF12</i>	↑	
<i>TNFSF14</i>	↑	
<i>TP53INP1</i>	↑	
<i>TRAF1</i>	↑	
<i>TXNIP</i>	↑	
<i>VEGFA</i>	↑	↑
<i>WWOX</i>	↓	↓
<i>ZC3H8</i>	↑	

**Tab. 6: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse des biologischen Prozesses der Apoptoseregulation 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ - und 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

**Tab. 7: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Apoptose 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{123}\text{IdU}$ -Exposition zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

Apoptose	
	2,6 Gy $^{123}\text{IdU}$ (6 h nach 20 h Exp.)
<i>BCL2A1</i>	↓
<i>HSPA1A</i>	↓
<i>JDP2</i>	↑
<i>JUN</i>	↑
<i>LTB</i>	↓
<i>TNF</i>	↓

**Tab. 8: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse dem Steroidmetabolismus 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

Steroidmetabolismus	
	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
ADM	↑
AKR1C1	↑
APOBR	↑
CYP11B1	↑
CYP39A1	↑
DHCR24	↓
DHCR7	↓
HMGCR	↓
HMGCS1	↓
IL4	↑
INSIG1	↓
LDLR	↓
LSS	↓
OSBPL10	↓
OSBPL6	↓
SC4MOL	↓
SOAT2	↓
SQLE	↓
SREBF1	↓
SULT1A4	↓
TNFSF4	↓
VLDLR	↓
WWOX	↓

**Tab. 10: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der positiven Regulation der DNA-Reparatur 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

#### Positive Regulation der DNA-Reparatur

	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
CEBPG	↑
FAM175A	↑
RNF168	↓
UBE2N	↓

**Tab. 9: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der Transkriptionsregulation 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{125}\text{I}$ IdU-Exposition zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

Transkriptionsregulation	
	2,6 Gy $^{125}\text{I}$ IdU (6 h nach 20 h Exp.)
ARID5B	↑
ATF3	↓
CTBP1	↓
EGR4	↑
ERN1	↓
FOXA1	↓
FOXD4	↓
GMEB1	↓
HES4	↑
HEY1	↓
HOXB9	↑
IL16	↓
JDP2	↑
JUN	↑
LHX6	↑
LOC100506544	↑
MKX	↑
MXD1	↑
MYCN	↑
NFE4	↓
NR2F1	↓
PAX6	↑
PRDM2	↓
SKIL	↓
SMYD1	↑
SP4	↓
SP5	↑
TBX1	↑
TNF	↓
TNFSF4	↑
TRIB1	↑
TRPS1	↑
VEGFA	↑
YEATS2	↓
ZBTB33	↓
ZNF143	↑
ZNF425	↑
ZNF587	↑
ZNF683	↓
ZNF738	↑

**Tab. 11: Signifikant veränderte Gene, die bei der Analyse der biologischen Prozesse der negativen Zellzyklusregulation 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

#### Negative Zellzyklusregulation

	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
ADCYAPI	↑
BUB1	↓
CENPE	↓
CENPF	↓
FAM5C	↓
FOXC1	↑
HEXIM1	↓
HEXIM2	↑
HPGD	↑

**Tab. 13: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Antigenprozessierung und -präsentation 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

**Antigenprozessierung und  
-präsentation**

	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
<i>CD8A</i>	↑
<i>CREB1</i>	↓
<i>HLA-DOA</i>	↑
<i>HLA-DRB5</i>	↑
<i>HSP90AA1</i>	↓
<i>HSP90AB1</i>	↓
<i>HSPA1A</i>	↓
<i>HSPA5</i>	↓
<i>HSPA8</i>	↓
<i>NFYA</i>	↓

**Tab. 12: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion 6 h nach 20-stündiger 2,6 Gy  $^{125}$ IdU-Exposition zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

**Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion**

	2,6 Gy $^{125}$ IdU (6 h nach 20 h Exp.)
<i>CCR1</i>	↓
<i>CCR2</i>	↓
<i>CCR7</i>	↓
<i>CX3CR1</i>	↓
<i>FLT3</i>	↑
<i>HSIL5R2</i>	↑
<i>IL10RA</i>	↑
<i>LTB</i>	↓
<i>TNF</i>	↓
<i>TNFSF4</i>	↑
<i>VEGFA</i>	↑

**Tab. 14: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse der Steroidbiosynthese 24 h nach 10 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

**Steroidbiosynthese**

	10 Gy $\gamma$ -Strahlung (24 h)
<i>DHCR24</i>	↓
<i>DHCR7</i>	↓
<i>LSS</i>	↓
<i>SC4MOL</i>	↓
<i>SOAT2</i>	↑
<i>SQLE</i>	↓

**Tab. 15: Signifikant veränderte Gene, die bei der Signalwegsanalyse dem Kalziumsignalweg 24 h nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung zugeordnet wurden.**

↓ bzw. ↑ zeigt die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens gegenüber der eigenen unbestrahlten Kontrolle.

**Kalziumsignalweg**

	1 Gy $\alpha$ -Strahlung (24 h)
<i>ADRB2</i>	↑
<i>CACNA1I</i>	↑
<i>CD38</i>	↑
<i>GNA15</i>	↓
<i>HRH1</i>	↑
<i>HTR2B</i>	↓
<i>P2RX7</i>	↑
<i>PLCB2</i>	↑
<i>TNNC2</i>	↑

## **8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 9. Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Analyse der Genexpression und Charakterisierung der biologischen Wirkung in der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Marcus Unverricht-Yeboah befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift d. wissenschaftl.  
Betreuers/Mitglieds der Universität  
Duisburg-Essen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktoranden